



**HAL**  
open science

# Mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement impliqués dans la régulation du stock de cellules souches spermatogoniales chez le poisson-zèbre *Danio rerio*

Edouard Curran

## ► To cite this version:

Edouard Curran. Mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement impliqués dans la régulation du stock de cellules souches spermatogoniales chez le poisson-zèbre *Danio rerio*. Agronomie. Agrocampus Ouest, 2016. Français. NNT : 2016NSARH099 . tel-01538419

**HAL Id: tel-01538419**

**<https://theses.hal.science/tel-01538419>**

Submitted on 13 Jun 2017

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE

BRETAGNE

LOIRE

AGRO  
CAMPUS

OUEST

Édouard CURRAN • 16 décembre 2016

Thèse AGROCAMPUS OUEST  
sous le label de l'Université de Bretagne Loire  
pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST**  
Spécialité Biologie et Agronomie

ÉCOLE DOCTORALE • Vie - Agro - Santé (VAS)  
LABORATOIRE D'ACCUEIL • INRA UR 1037 Laboratoire  
de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP)

**Mécanismes cellulaires et  
moléculaires potentiellement  
impliqués dans la régulation  
du stock de cellules souches  
spermatogoniales chez le  
poisson-zèbre *Danio rerio***

**Sandrine LAGARRIGUE**  
Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO PEGASE /  
*présidente*

**Pascal SOURDAINE**  
Professeur, Université de Caen / *rapporteur*

**Clothilde HEUDE**  
Maître de conférences, Université de Caen /  
*rapporteuse*

**Jean-Stéphane JOLY**  
Directeur de recherche, INRA Gif-sur-Yvette /  
*examineur*

**Frédéric CHALMEL**  
Chargé de recherche, IRSET Rennes /  
*examineur*

**Jean-Jacques LAREYRE**  
Directeur de recherche, INRA Rennes /  
*directeur de thèse*

N° Série : H-99  
N° Ordre : 2016-42

UNIVERSITE  
BRETAGNE  
LOIRE

AGRO  
CAMPUS

OUEST

**Édouard CURRAN • 16 décembre 2016**

**Thèse AGROCAMPUS OUEST**  
sous le label de l'Université de Bretagne Loire  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST  
Spécialité Biologie et Agronomie

ÉCOLE DOCTORALE • Vie-Agro-Santé (VAS)  
LABORATOIRE D'ACCUEIL • INRA UR 1037 Laboratoire  
de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP)

**Mécanismes cellulaires et  
moléculaires potentiellement  
impliqués dans la régulation  
du stock de cellules souches  
spermatogoniales chez le  
poisson-zèbre *Danio rerio***

**Sandrine LAGARRIGUE**

Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO PEGASE /  
*présidente*

**Pascal SOURDAINE**

Professeur, Universités de Caen / *rapporteur*

**Clothilde HEUDE**

Maître de conférences, Université de Caen /  
*Rapporteuse*

**Jean-Stéphane JOLY**

Directeur de recherches, INRA Gif-sur-yvette /  
*examineur*

**Frédéric CHALMEL**

Chargé de recherche, IRSET, Rennes /  
*examineur*

**Jean-Jacques LAREYRE**

Directeur de recherche, INRA, Rennes /  
*directeur de thèse*

La science est une chose merveilleuse... tant qu'il ne faut pas en vivre!  
Einstein (1879/1955)

## Remerciements

Je veux dans un premier temps remercier tout particulièrement mon directeur de thèse Jean-Jacques Lareyre. Son enthousiasme et son optimisme ont été une réelle motivation tout au long de cette thèse. Il m'a aussi permis d'appréhender les différentes facettes du métier de chercheur, tant à la paillasse que derrière un ordinateur. Merci aussi pour votre confiance et votre aide (surtout lors de nos grosses séances d'abatage pour les expériences de dissociation).

Je remercie aussi Florence Le Gac, ma co-directrice de thèse pour son analyse toujours pertinente des données et ses conseils avisés lors de la préparation de nos expériences ou le traitement de nos données.

Merci aussi à tous les autres membres de l'équipe, Anne-Sophie pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa parfaite organisation. Merci à Élisabeth pour sa bonne humeur, ses conseils avisés et son expertise orthographique qui ont été d'une très grande aide pour moi. Merci aussi à Alexandra pour son dynamisme et son aide dans les transplantations des poissons.

Un grand merci aussi à Océane (stagiaire en BTS), et Kilian (stagiaire de master 1) pour leur attention, leur sérieux et l'aide qu'ils nous ont apporté dans la préparation et la réalisation d'expérience d'hybridation *in toto* et de qPCR.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Bertrand Pain, mon tuteur Charles Pineau, Isabelle Allemand, Frédéric Chalmel, Aude Gautier, Catherine Labbé et Violette Thermes pour leurs conseils et les discussions passionnantes que l'on a pu avoir lors des réunions de comité, ou lors d'autres réunions. Merci à Annie Trautwetter de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de découvrir le monde de l'enseignement.

Un grand merci aussi à Pascal Sourdain et Clothilde Heude d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, à Jean-Stéphane Joly et Frédéric Chalmel d'être examinateurs et enfin à Sandrine Lagarrigue de tenir le rôle de présidente du jury.

Merci aussi à tous les autres membres de l'unité pour leur aide que ce soit d'un point de vue technique (Cécile, Béatrice...) ou administratif (Guylène, Céline, Patricia, Nathalie) et de manière globale tout le monde pour la bonne ambiance et les discussions toujours intéressantes au sein du laboratoire, lors des pauses café ou des réunions d'unité, etc.

Je voulais aussi remercier Laurent et Gersende pour leur aide sur la plateforme de tri cellulaire, Irina Kolotuev pour les très belles images de microscopie électronique, Clemence Kress pour ces immunohistochimies et bien sûr Taiju Saito (le Lucky Luke de la micro-injection).

Je n'oublie pas bien entendu le personnel des installations expérimentales, tout particulièrement Amélie qui s'occupe des poisson-zèbre et qui s'est toujours montrée disponible et à l'écoute de nos besoins. Je remercie aussi tous les autres membres des installations qui se relaient pour veiller 7 jours sur 7 sur les poissons.

Je souhaitais aussi remercier tout particulièrement les nombreux non-titulaires que j'ai pu rencontrer durant ces trois années. Je pense notamment aux anciens comme Aurelien, Joahna, Éliisa, Bastien et Jeremy qui m'ont tout de suite intégré à leur petit groupe et avec qui j'ai partagé de nombreux repas que ce soit au sein du laboratoire ou bien lors de soirées toujours plus sympathiques les unes que les autres.

Merci aussi à Amine, qui est arrivé en même temps que moi et avec qui j'ai partagé un bureau pendant presque 2 ans. Nos nombreuses discussions ont assurément fait avancé la science à grands pas et nous ont, je pense, rapproché du prix Nobel de biologie.

Merci bien sûr à tous les autres, Ozlem, Mia, Florian (L'as du laser game), Ahmed (L'homme au prénom imprononçable), Sabrina (La pro du créneau), Maxence (Le chef de la 3D), Benjamin (Le parrain du ping-pong) et Stéphanie (notre non-titulaire d'adoption)... cela me prendrait trop de temps de raconter tous les très bons moments, fous rires, soirées, barbecues, laser-game passés ensemble. Vous m'avez permis de vivre une thèse extrêmement agréable (et oui c'est possible), et je sais que ça va être difficile de retrouver une ambiance aussi bonne que celle que l'on a créé tous ensemble. Encore un très très grand merci.

Si cette bonne ambiance a été un élément de motivation, je n'oublie absolument pas l'importance de ma famille et de mes amis. Là encore, ça me prendrait trop de temps de remercier tout le monde, mais je tenais à remercier tous les membres de ma famille pour leur soutien sans faille dans cette longue entreprise qu'est la thèse.

Merci à Jérémy, mon ami depuis près de 22ans pour ton soutien, je sais que je pourrais toujours compter sur toi. Je profite aussi de ces quelques lignes pour te féliciter, car tu vas bientôt être papa. C'est vraiment une merveilleuse nouvelle... même si je ne suis pas sûr que vous ayez fait le bon choix de parrain ;-). Merci aussi à Nicolas (Nicos de la Noche) l'autre membre de notre trio diabolique, ton soutien, ta gaité ont toujours été d'un grand réconfort. Je pense aussi très fortement à tous mes autres amis que j'ai rencontré sur les bancs de la fac de bio, comme Laurent, Kevin, Géraldine, Laurie, Lisa, Sophie, Vianney et Nicolas.

Enfin, je tenais à finir par remercier quelqu'un en particulier, ma fiancée Giulia. On s'est rencontré au tout début de ma thèse, tu as donc eu le bonheur (ou pas) de me suivre tout au long de ces trois années. Tu as toujours été là pour moi, tu m'as soutenu, tu m'as aidé et tu as toujours cru en moi. Merci aussi pour les deux merveilleux voyage que l'on a fait ensemble durant cette thèse (Costa-rica et Bali) qui m'ont permis de vraiment faire une pause durant ces années intenses.

Un grand merci à tous,

## Liste des abréviations

### Termes généraux

<b>Aal</b>	Spermatogonie A aligned
<b>Adiff</b>	Spermatogonie A differentiated
<b>Ap</b>	Spermatogonie A paired
<b>As</b>	Spermatogonie A single
<b>Aind</b>	Spermatogonies A indifférenciées
<b>Aund</b>	Spermatogonie A undifférenciée
<b>CySC</b>	Cyste Stem Cell
<b>GSC</b>	Germinales Stem Cell
<b>HIT</b>	Hybridation In Toto
<b>ICC</b>	Immunocytochimie
<b>JAM</b>	Junctional Adhesion Molecules
<b>JPF</b>	Jour Post Fécondation
<b>PGC</b>	Primordial Germ Cell
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SP</b>	Side Population
<b>SSC</b>	Spermatogonial Stem Cell

### Noms complets de protéines

<b>11KT</b>	11-Ketotestosterone
<b>Abp</b>	Actin Binding Protein
<b>Amh</b>	Anti-müllerian hormone
<b>APC2</b>	Adenomatosis Polyposis Coli 2
<b>BCL2</b>	B-Cell CLL/Lymphoma 2
<b>BCL6B</b>	B-Cell CLL/Lymphoma 6B
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>CCL9</b>	C-C Motif Chemokine Ligand
<b>ccnd1</b>	Cyclin d&Cdc25
<b>CCNE1</b>	Cyclin E1
<b>Cdc25</b>	Cell Division Cycle 25C
<b>Cea</b>	Cellular atoll
<b>Cei</b>	Cellular island
<b>Cr14</b>	Cullin 4 ring Ubiquitin Ligase
<b>CSF1</b>	Colony stimulator factor 1
<b>CXCL12</b>	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
<b>CXCR4</b>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
<b>CXCR7</b>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 7
<b>CYP26B1</b>	Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1
<b>Dally</b>	Division Abnormally Delayed
<b>DAZL</b>	Deleted In Azoospermia Like
<b>Dcaf</b>	Ddb1 and Cul4 associated factors
<b>DDB1</b>	Damage Specific DNA Binding Protein 1
<b>DHP</b>	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one
<b>DMC1</b>	DNA Meiotic Recombinase 1
<b>DNMR1</b>	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1

<b>DND</b>	Dead end
<b>DNMT3</b>	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3
<b>Dpp</b>	Decapentaplegic
<b>E2</b>	17 $\beta$ -estradiol
<b>EGR3</b>	Early Growth Response
<b>EIF3</b>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3
<b>ESR1</b>	Estrogen receptor
<b>eSR34</b>	Eel spermatogenesis related substance 34
<b>ETV5</b>	ETS Variant 5
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FGFR1</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
<b>FSH</b>	Follicle Stimulating Hormone
<b>FSHR</b>	Follicle Stimulating Hormone Receptor
<b>Gbb</b>	Glass Bottom Boat
<b>Gcl</b>	Germ cell-less
<b>GDNF</b>	Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
<b>GFRA1</b>	GDNF Family Receptor Alpha 1
<b>Ggt1</b>	Geranylgeranyl-transférase
<b>GPER1</b>	G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1
<b>GSDF</b>	Gonadal soma derived growth factor
<b>HIF2a</b>	Hypoxia-inducible Factor2a
<b>HmgcoAR</b>	Hydroxymethylglutaryl coenzyme A réductase
<b>ID4</b>	Inhibitor Of DNA Binding 4
<b>IFITM1</b>	Interferon induced membrane protéine
<b>IGF1</b>	Insulin Like Growth Factor 1
<b>Imp</b>	IGF-II mRNA-binding proteins
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>JNK</b>	Jun N-terminal kinase
<b>KLF2</b>	Kruppel-Like Factor 2
<b>Lar</b>	Leukocyte common antigen-related
<b>LH</b>	Luteinizing Hormone
<b>LHX</b>	LIM Homeobox
<b>LIF</b>	Leukemia Inhibitory Factor
<b>Lola</b>	Longitudinals Lacking
<b>Mdr49</b>	Multidrug resistance 49
<b>MESP1</b>	Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 1
<b>Mtlrrna</b>	Mitochondrial Large Ribosomal rna
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>Nedd8</b>	Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8
<b>NEURL4</b>	Neuralized E3 Ubiquitin Protein Ligase 4
<b>NGN</b>	Neurogenin 1
<b>NOX3</b>	NADPH Oxidase 3
<b>oct4 = POU5F1</b>	POU Class 5 Homeobox 1
<b>PCF</b>	Palmar cell polarity
<b>PKD1</b>	Protéine 3-phosphoinositide-dépendante kinase1

<b>Pgc</b>	Polar granule component
<b>POU3F1</b>	POU Class 3 Homeobox 1
<b>PRDM14</b>	PR Domain 14
<b>PRM1</b>	Protamine 1
<b>P-tefb</b>	Positive Transcription Factor Elongation b
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homologue
<b>RA</b>	Retinoic acid
<b>Rbx1</b>	Ring-Box 1
<b>ROR2</b>	Receptor tyrosine kinase like Orphan receptor 2
<b>SALL4</b>	Spalt-Like Transcription Factor 4
<b>SCF</b>	Stem cell factor
<b>Sdf-1</b>	Somal-derived-factor1
<b>SFK</b>	Src-family kinases
<b>SOX2</b>	SRY-Box 2
<b>STAT</b>	Signal Transducer And Activator Of Transcription
<b>STELLA</b>	Developmental Pluripotency Associated 3
<b>Stra8</b>	Stimulated By Retinoic Acid 8)
<b>SYCE1</b>	Synaptonemal Complex Central Element Protein 1
<b>SYCP</b>	Synaptonemal Complex protein
<b>TAF4b</b>	TBP-associated Factors 4b
<b>Tcfap2c</b>	Transcription Factor AP-2 Gamma
<b>TEX12</b>	Testis Expressed 12
<b>TGFb</b>	Transforming Growth Factor Beta
<b>TNP1</b>	Transition Protein 1
<b>Ube2m</b>	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 M
<b>UHRF1</b>	Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains 1
<b>Upd</b>	Unpaired
<b>WNT</b>	Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3A
<b>ZBTB16</b>	Zinc Finger And BTB Domain Containing 16
<b>Zpg</b>	Zero population growth



## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Origine des cellules germinales souches</b> .....	<b>2</b>
1.1. Origines et déterminismes des cellules souches primordiales (PGCs).....	2
1.2. Migration des cellules germinales .....	7
<b>2. La spermatogenèse</b> .....	<b>11</b>
2.1. Les spermatogonies A et B.....	11
2.2. Les cellules méiotiques.....	13
2.3. Les cellules post-méiotiques .....	14
<b>3. Structure et organisation du testicule chez les poissons adultes</b> .....	<b>16</b>
3.1. Structure.....	16
3.2. Organisation du testicule.....	17
<b>4. Notion de niche germinale</b> .....	<b>19</b>
4.1. Caractérisation et définition des SSC.....	20
4.2. La cellule de Sertoli .....	25
<b>5. Mécanismes cellulaires impliqués dans le renouvellement du stock de SSC</b> ....	<b>29</b>
5.1. Maintien du stock de SSC par division asymétrique .....	29
5.2. Maintien et amplification du stock de SSC par division symétrique .....	30
5.3. Fragmentation clonale et interconversion de progéniteurs. ....	30
<b>6. Mécanismes moléculaires impliqués dans le renouvellement du stock de SSC.</b> .....	<b>32</b>
6.1. Régulations paracrines et intracellulaires.....	32
6.1.1. <i>Drosophile</i> .....	32
6.1.2. <i>Mammifères</i> .....	35
6.1.3. <i>Poissons</i> .....	42
6.2. Régulation endocrine du renouvellement du stock de SSC .....	47
6.2.1. <i>Gonadotropines</i> .....	47
6.2.2. <i>Stéroïdes sexuels</i> .....	49
<b>7. Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation spermatogoniale</b> .....	<b>51</b>
7.1. Chez les invertébrés.....	51
7.2. Chez les mammifères.....	52
7.3. Chez les poissons.....	56
<b>8. Le poisson zèbre, une espèce modèle</b> .....	<b>56</b>
8.1. Présentation générale .....	57
8.2. Différenciation sexuelle et cinétique d'initiation de la gamétogenèse .....	60

8.3.	Régulation des cycles de reproduction.....	62
8.4.	Structure du testicule et cycle spermatogénétique chez l'adulte sexuellement mature .....	63
8.5.	Obtention de lignées transgéniques de poisson-zèbre bien adaptées à l'étude de la niche germinale.....	65
<b>Projet de thèse.....</b>		<b>68</b>
	Contexte et enjeux liés au projet de thèse :.....	69
	Problématique Scientifique.....	71
	Objectifs de la thèse.....	72
<b>Matériel et Méthode.....</b>		<b>74</b>
<b>1.</b>	<b>Origine et manipulation des poissons-zèbres.....</b>	<b>75</b>
1.1.	Origine et entretien des poissons-zèbres .....	75
1.2.	Production de poissons-zèbres dépourvus de cellules germinales .....	75
1.3.	Production de poissons-zèbres triploïdes.....	76
<b>2.</b>	<b>Production de lignées transgéniques vasa :eGFP.....</b>	<b>77</b>
2.1.	Préparation du transgène.....	77
2.2.	Injection .....	77
2.3.	Production des animaux transgéniques et génotypage.....	78
<b>3.</b>	<b>Analyse de l'expression des gènes.....</b>	<b>78</b>
3.1.	Extractions des ARNs .....	79
3.2.	Choix des amorces spécifiques.....	79
3.3.	Rétro-transcription (RT) .....	80
3.4.	PCR quantitative (qPCR).....	80
<b>4.</b>	<b>Hybridation In toto d'ARN messenger (HIT) .....</b>	<b>81</b>
4.1.	Production des ribosondes .....	81
4.2.	Hybridation .....	82
4.3.	Révélations .....	83
<b>5.</b>	<b>Immunocytochimie (ICC) .....</b>	<b>84</b>
5.1.	Combinaison ICC/HIT .....	85
<b>6.</b>	<b>Purifications cellulaires et tri par FACs.....</b>	<b>85</b>
6.1.	Purification .....	85
6.2.	Pré-enrichissement des fractions cellulaires à trier (plating) .....	86
6.3.	Tri cellulaire .....	87
<b>7.</b>	<b>Evaluation des propriétés souches des cellules germinales fluorescentes.....</b>	<b>88</b>
7.1.	Transplantation .....	88
7.2.	Traitement des poissons au busulfan.....	89

<b>8. Production et traitement des données de Rnaseq .....</b>	<b>89</b>
8.1. Extraction des ARNs totaux et séquençage à ultra haut débit .....	89
8.2. Prétraitement des données de RNA-seq.....	89
8.3. Alignement des lectures sur le génome de référence .....	89
8.4. Filtration statistique des transcrits différentiellement exprimés .....	91
<b>9. Analyse de l'histoire évolutive de gènes d'intérêt .....</b>	<b>92</b>
9.1. Analyses phylogénétiques.....	92
9.2. Analyse de synténies .....	92
<b>RESULTATS .....</b>	<b>93</b>
<b>Partie 1 : Caractérisation d'une sous-population de spermatogonies indifférenciées chez le poisson-zèbre .....</b>	<b>93</b>
<b>1. Caractérisation des cellules de la lignée transgénique Dr_vasa :eGFPtol2.....</b>	<b>94</b>
1.1. Production de la lignée transgénique Dr_vasa:eGFPtol2.....	94
1.2. Le transgène s'exprime dans des doublets asymétriques de spermatogonies A .....	95
1.3. Caractérisation moléculaire des spermatogonies exprimant la GFP.....	98
1.4. Analyse des propriétés fonctionnelles des cellules spermatogoniales fluorescentes triées .....	103
1.5. Bilan des résultats obtenus.....	106
<b>Partie 2 : Identification de nouvelles voies de régulation paracrine potentiellement impliquées dans la régulation du stock de SSC.....</b>	<b>107</b>
<b>1. Analyse globale du transcriptome des différents types cellulaires purifiés ..</b>	<b>109</b>
1.1. Analyse du transcriptome des cellules de Sertoli.....	110
1.2. Analyse du transcriptome des cellules spermatogoniales purifiées .....	113
<b>2. Le transcriptome des cellules spermatogoniales purifiées est cohérent avec celui des spermatogonies de type Apr et des SSC des mammifères. ....</b>	<b>115</b>
<b>3. Recherche de nouvelles voies de régulations paracrines du devenir des cellules spermatogoniales indifférenciées.....</b>	<b>117</b>
3.1. Analyse des récepteurs nucléaires .....	118
3.2. Analyse des récepteurs membranaires .....	119
3.3. Analyse des ligands sertolien.....	122
3.4. Identification de couple ligand/récepteur d'intérêt.....	124
<b>Partie 3: Conservation des voies de régulation paracrine potentiellement impliquées dans la régulation du stock de SSC chez les vertébrés. ....</b>	<b>125</b>
<b>1. Conservation des gènes impliqués dans les voies de régulation candidates chez les vertébrés.....</b>	<b>127</b>
1.1. Voie de régulation paracrine potentielle Ednrba/Edn2 .....	127
1.2. Voie de régulation paracrine potentielle P2RY1b/ADP extracellulaire.....	128
1.3. Voie de régulation paracrine potentielle Ccr6/Ccl20 et Gpr37/Psap.....	129

1.4.	Voie de régulation paracrine potentielle acvr2b-2/membres des TGF beta .....	130
1.5.	Voie de régulation paracrine par les récepteurs orphelins GPR144 .....	130
<b>2.</b>	<b>Conservation du profil d'expression tissulaire et cellulaire chez la truite arc-en-ciel .....</b>	<b>131</b>
2.1.	Profil d'expression tissulaire .....	131
2.2.	Profil d'expression gonadique au cours de l'ontogenèse .....	132
2.3.	Profil d'expression cellulaire.....	133
	<b>Discussion .....</b>	<b>135</b>
<b>1.</b>	<b>Caractérisation des spermatogonies fluorescentes de la lignée vasa :eGFPTol2. 136</b>	
1.1.	Le fragment promoteur (-1481/+506) du gène <i>vasa</i> ne possède pas toute l'information nécessaire pour mimer le patron d'expression du gène <i>vasa</i> endogène .....	136
1.2.	L'expression asymétrique des transcrits <i>gfp</i> confirment l'existence de divisions asymétriques des spermatogonies indifférenciées chez le poisson-zèbre adulte .....	138
1.3.	Les spermatogonies en paire du poisson-zèbre présentent une signature moléculaire similaire mais pas identique à celle des SCC des autres poissons ou des SSC mammaliennes. ....	140
1.4.	Les spermatogonies fluorescentes en paires et/ou isolées font partie du pool de SSC .....	143
1.5.	Proposition d'un nouveau modèle hypothétique du processus de renouvellement des SSC chez le zebrafish adulte.....	144
<b>2.</b>	<b>Identification des voies de régulation potentiellement impliquées dans le contrôle du devenir des SSC.....</b>	<b>145</b>
2.1.	Les spermatogonies indifférenciées du poisson-zèbre expriment de nombreux récepteurs nucléaires et protéines membranaires qui régulent le devenir des SSC chez les vertébrés.....	146
2.2.	Certaines voies de régulation du devenir des SSC ne semblent pas conservées chez le poisson-zèbre.....	150
2.3.	Identification de nouvelles voies de régulation candidates qui pourraient être impliqués dans le contrôle du devenir des SSC .....	151
<b>3.</b>	<b>Perspectives et conclusions .....</b>	<b>155</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>158</b>



# **INTRODUCTION**

## **1. Origine des cellules germinales souches**

Chez les poissons et les mammifères, les cellules formant la première population déterminée de cellules germinales sont appelées cellules germinales primordiales (PGC : Primordial germ Cell). Ces cellules ont été pour la première fois identifiées grâce à leurs caractéristiques morphologiques (Nieuwkoop and Sutasurya, 1979). Ce sont de grandes cellules (10-20µm), le cytoplasme est en général dense aux électrons avec un large noyau présentant un ou deux nucléoles denses et une membrane nucléaire invaginée. L'analyse de l'ultrastructure de ses PGC montre aussi la présence de mitochondries rondes et des granules appelés « nuage » ou « germplasm » (Braat et al., 1999a; Gamo, 1961; Nedelea and Steopoe, 1970). Ce nuage a été décrit dans de nombreuses espèces (Eddy, 1975) à des stades différents de la spermatogénèse, suggérant un rôle très important dans le développement de la lignée germinale. En effet, ce nuage contient des ARNs et protéines qui sont nécessaires à la différenciation et à la détermination des PGC (Li et al., 2016; Maegawa et al., 1999; Seydoux and Dunn, 1997; Williamson and Lehmann, 1996). Le cytoplasme des PGC est plus riche en glycogène et elles sont en général positives aux marquages avec le Best carmine et l'acide périodique de Schiff. Chez de nombreuses espèces, les PGC expriment la phosphatase alcaline. Ces différentes caractéristiques morphologiques et biochimiques ont ainsi permis de mieux identifier les PGC et de les visualiser à des stades précoces du développement chez les mammifères, (Chiquoine, 1954) ou les poissons comme le poisson-zèbre (Braat et al., 1999a, Deniz-Koç and Yüce, 2013), le médaka (Gamo, 1961), la carpe (Nedelea and Steopoe, 1970) ou certains salmonidés (Johnston, 1951) pour en déterminer l'origine.

### **1.1. Origines et déterminismes des cellules souches primordiales (PGCs)**

La ségrégation entre les cellules germinales et les cellules somatiques se déroule durant le développement embryonnaire précoce. La spécification des PGC a lieu dans une zone éloignée de la future gonade ce qui oblige les PGC à migrer à travers les tissus pour rejoindre les crêtes germinales, lieux du développement de la future gonade. Dans le règne animal, il existe deux mécanismes distincts de déterminisme.

Chez les nématodes, les insectes, les poissons (Illmensee and Mahowald, 1976; Lehmann and Ephrussi, 1994; Williamson and Lehmann, 1996) et les amphibiens (Dixon, 1980; Ikenishi, 1998) on parle de modèle « préformistique ». Les cellules embryonnaires souches incorporent à partir des réserves vitellines un déterminant cytoplasmique d'origine maternelle qui les assignera à devenir les futures cellules souches germinales primordiales. Chez les mammifères, la spécification est plus tardive et elle intervient selon un modèle dit « épigénétique » où les cellules germinales seront déterminées par un signal cellulaire provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire postérieur qui va agir au niveau de l'épiblaste de l'embryon (Lawson et al., 1999; Reik and Surani, 2015; Ying et al., 2000).

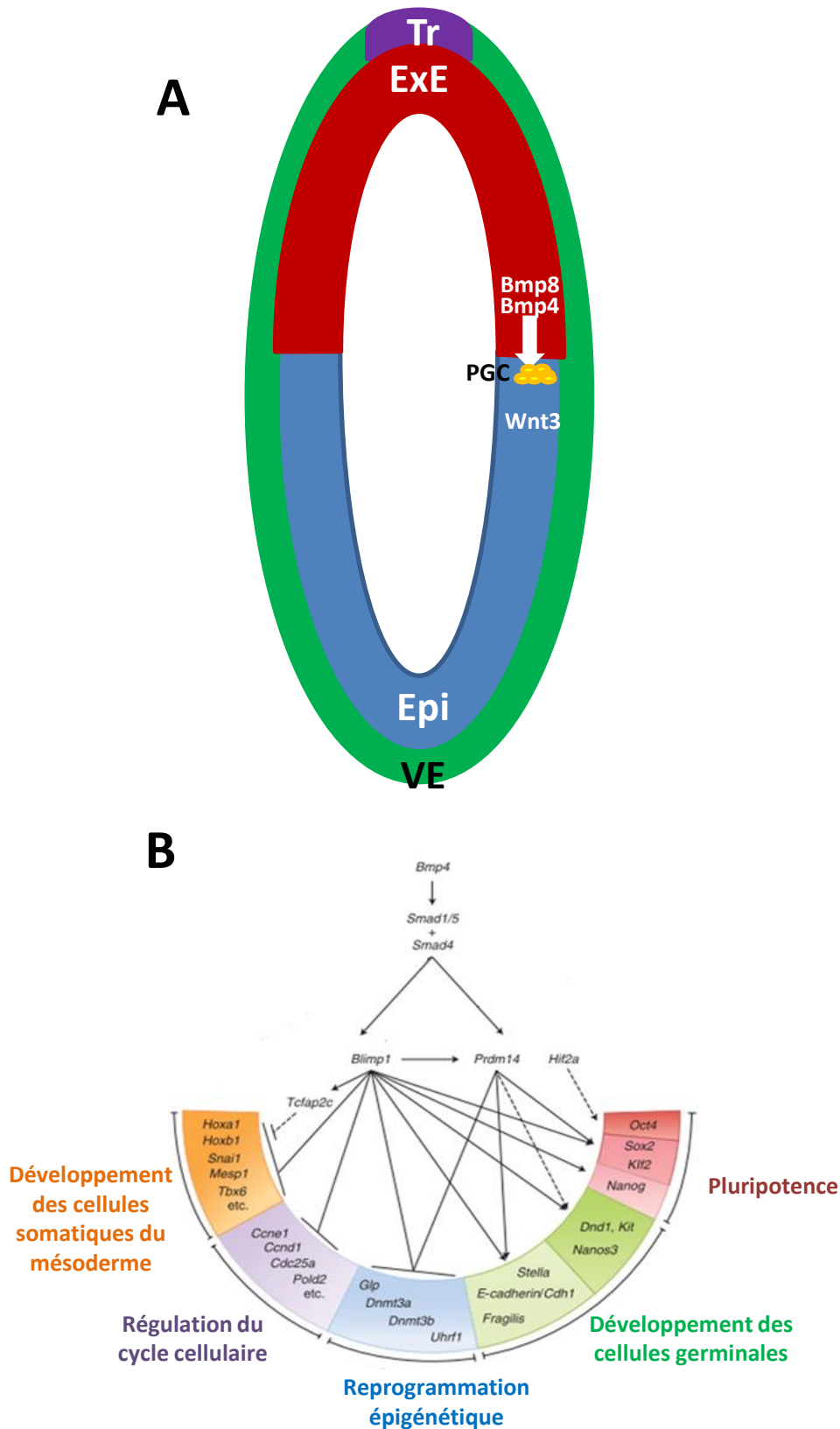
### **1.1.1. Le modèle épigénétique**

Chez les mammifères, les PGC ont été facilement identifiées grâce à leur forte activité alcaline phosphatase (Chiquoine, 1954). Ainsi chez la souris, les PGC commencent à être visibles entre 6,5 et 7,5 jours après fécondation avec un cluster d'une quarantaine de cellules qui apparaît à proximité de l'allantoïde (figure1).

L'identification de ces PGC a permis de réaliser de nombreuses études, *in vitro* et *in vivo*, qui ont mis en évidence un certain nombre de molécules impliquées dans la spécification des PGC. L'initiation de cette spécification se déroule au niveau de l'épiblaste de l'embryon et va nécessiter l'intervention de 3 protéines signal importantes, WNT3 (Wnt Family Member 3A) un ligand spécifique des récepteurs frizzled, BMP8 (Bone morphogenetic protein 8) et BMP4, deux membres de la famille TGF-beta (figure 1). WNT3 va permettre de conférer aux cellules de l'épiblaste la capacité de répondre au signal BMP porté par la BMP4, alors que de son côté la BMP8 protège cette initiation en modulant l'activité inhibitrice de l'endoderme viscéral antérieur contre BMP4 (Ohinata et al., 2009). L'intégration du signal BMP par les cellules cibles va entraîner l'expression de *Blimp1* à E6.25, *Prdm14* (pr domain14) à E6.5 et *Tcfap2c* (Transcription Factor Ap-2 Gamma) à E6.75 qui vont à leur tour pouvoir avoir de multiples actions (figure 1). Les 3 facteurs de transcription issus de ces 3 gènes vont en effet être impliqués dans la régulation de nombreux processus.

Le répresseur transcriptionnel BLIMP1, avec l'aide du facteur de transcription SALL4 (Spalt-Like Transcription Factor 4), réprime des gènes spécifiques au





**Figure1 : Modèle épigénétique de la spécification des PGC chez la souris. A :** Schéma représentant une coupe d'embryon d'environ 6 jours après fécondation. Wnt3 permet de préparer les cellules de l'épiblaste (Epi) à recevoir les signaux BMP provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire (Exe). BMP4 va donc induire la spécification des PGCs au niveau de l'épiblaste alors que BMP8 va lui réguler l'action de l'endothélium ventral (VE). (Tr : trophoblaste). **B :** Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle induite par BMP4. Les lignes en trait plein signifient un impact vérifié in vivo (kurimoto 2008 et Yamaji et al 2008), et en pointillé in vitro (covello et al 2006 et west et al 2009 et weber et al 2010).

programme génétique des cellules somatiques du mésoderme, comme les gènes *Hox*, qui sont des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la morphogenèse et la différenciation (Murtha et al., 1991; Sakiyama et al., 2001; Taylor et al., 1997). *Snail*, qui est un gène bien connu chez la drosophile, code un répresseur de transcription en doigt de zinc qui baisse l'expression de gènes endodermaux à l'intérieur du mésoderme (Bothma et al., 2011) ou encore *Mesp1* (Mesoderm Posterior Bhlh Transcription Factor 1) qui code pour un facteur de transcription jouant un rôle dans la formation de l'épithélium des somites du mésoderme (Liang et al., 2015). BLIMP1 va aussi moduler le cycle cellulaire en réprimant *Ccne1* (Cyclin E1), *Ccd1* (Cyclin D1), et *Cdc25* (Cell Division Cycle 25C) qui sont des gènes codant pour des cyclines très importantes dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire. Il va aussi réguler *Pold2* qui a un rôle dans la réparation et la réplication de l'ADN (figure 1).

BLIMP1 agit également avec le facteur de transcription PRDM14 pour réprimer des modifications épigénétiques, en agissant sur des gènes codants pour des méthyltransférases comme *Glp*, *Dnmt3a/b* (DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3), et *Uhrf1* (Ubiquitin Like With Phd And Ring Finger Domains 1). La répression de ces 3 gènes survient rapidement après la spécification des PGC (Kurimoto et al., 2008; Seki et al., 2005; Tachibana et al., 2005). Cette action va initier une reprogrammation épigénétique incluant une réduction de la diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2) et une augmentation de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) (Seisenberger et al., 2012; Seki et al., 2005). La faible quantité de H3K9me2, la forte présence de H3K27me3 et la limitation des activités méthyltransférase de l'ADN pourraient faciliter, une déméthylation passive et non active de l'ADN génomique. Les mécanismes et l'impact de la modification de la reprogrammation des histones chez les PGC sont encore mal connus. Il serait intéressant d'examiner les séquences qui perdent H3K9me2 et celles qui gagnent H3K27me3 afin de mieux comprendre le rôle de ces événements (Saitou and Yamaji, 2012). BLIMP1 et PRDM14 vont aussi avoir une action activatrice sur les gènes impliqués dans le développement et le maintien de la lignée germinale, comme *stella* (Developmental Pluripotency Associated 3), *fragilis*, *nanos3*, *dnd* (dead-end), *kit* (figure 1). En effet des mutations sur les protéines NANOS3, et DND sont connues pour entraîner une perte des cellules germinales en affectant leur survie ou leur

prolifération (De Felici and Farini, 2012). Le récepteur à la tyrosine kinase KIT et son ligand stem cell factor (SCF ou Kit ligand ) sont aussi impliqués dans la migration, la prolifération et la survie des PGC (Buehr et al., 1993; McCoshen and McCallion, 1975; Runyan et al., 2006).

Enfin, les deux protéines (BLIMP1 et PRDM14) ont un impact positif sur la pluripotence cellulaire en agissant sur *Nanog*, *Sox2* (Sry-Box 2), et *Klf2* (Kruppel-Like Factor 2) (figure 1) (Kurimoto et al., 2008; Saitou and Yamaji, 2012; Yamaji et al., 2008). Les rôles précis de ces gènes clefs de la pluripotence cellulaire, exprimés à de forts niveaux par les PGC, restent à être clarifiés, même si certains comme *Oct4/pou5f1* (Pou Class 5 Homeobox 1) et *Nanog* ont été montrés comme critiques pour la survie cellulaire à des stades plus tardifs du développement gonadique (Chambers et al., 2007; Kehler et al., 2004; Yamaguchi et al., 2009). De ce fait les facteurs de régulation de ces gènes peuvent aussi être critiques pour le développement des PGC, c'est le cas de HIF2a (hypoxia-inductible Factor2a) qui régule *Oct4* (Covello et al., 2006).

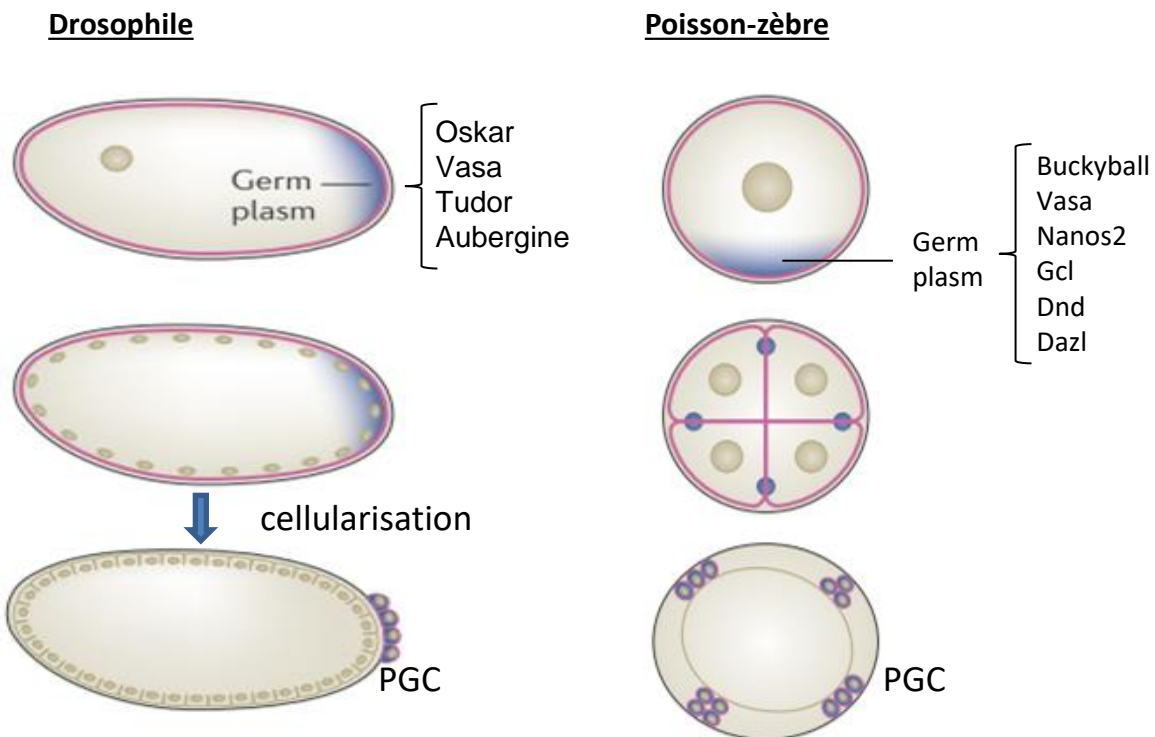
### **1.1.2. Le modèle préformistique**

Dans ce modèle, la spécification des PGC est initiée par l'incorporation d'un élément cytoplasmique d'origine maternelle. Ce modèle de spécification a été particulièrement bien étudié chez la drosophile, et il reste proche de ce qui a été observé chez les poissons ou les nématodes.

Chez la drosophile, tout va commencer au niveau de l'ovocyte. Une protéine de liaison à l'ARN appelée Oskar va débiter l'assemblage du plasma germinatif, avec l'aide d'autres protéines de liaison à l'ARN que sont Vasa, Tudor et Aubergine (Golubeski et al., 1991; Harris and Macdonald, 2001; Lasko and Ashburner, 1988; Snee and Macdonald, 2004). Une fois formé, le plasma germinatif va permettre le regroupement et la protection d'un certain nombre d'ARNs et de protéines d'origine maternelle (Bashirullah et al., 2001; Johnstone and Lasko, 2001). Il va être à l'origine de la formation, de la répression de la transcription et de la migration des PGC (Blackwell, 2004; Starz-Gaiano and Lehmann, 2001; Zalokar and Erk, 1976). Le plasma germinatif s'accumule dans la partie postérieure de l'embryon qui, au premier stade de développement, n'est encore qu'un immense syncytium de noyaux en

division. Il n'y a pour l'heure pas encore de membrane plasmique délimitant les cellules mais les noyaux qui se cellulariseront au pôle postérieur, vont incorporer du plasma germinatif et devenir les premières cellules germinales de l'embryon (figure 2). Cette spécification en cellule germinale semble bien dépendante de l'incorporation des protéines de liaison à l'ARN citées précédemment, puisque la mutation de ces éléments perturbe uniquement la mise en place des cellules germinales et non celle des cellules somatiques (Stein et al., 2002). Si ces protéines de liaison à l'ARN sont importantes dans la formation du plasma germinatif, d'autres facteurs interviennent dans les événements précoces de la spécification. Ainsi il a été démontré que Gcl (germ cell-less) une protéine de l'enveloppe nucléaire (Jongens et al., 1994; Leatherman et al., 2002), Mtlrna (Mitochondrial Large Ribosomal rna) un ARN de structure mitochondriale (Iida and Kobayashi, 1998), Tor (torso), un récepteur à la tyrosine kinase (Li et al., 2003; Martinho et al., 2004), Neurl4 (Neuralized E3 Ubiquitin Protein Ligase 4) une protéine du centrosome, (Jones and Macdonald, 2015) Piwi et Dicer 1 (Megosh et al., 2006) sont impliqués dans la formation ou la maintenance des PGC chez la drosophile.

Une fois les cellules germinales formées, les noyaux de celles-ci vont subir un phénomène de répression transcriptionnelle (Zalokar, 1976) qui rendront la cellule « silencieuse » jusqu'à 3,5h après la ponte (Martinho et al., 2004; Van Doren et al., 1998a). Cette étape importante dans la spécification des PGC est contrôlée par 4 gènes, *gcl*, *nos* (*nanos*), *pumillo*, et *pgc* (polar granule component). *gcl* semble impliqué dans le « silencing » du transcriptome (Leatherman et al., 2002). L'ARN de *nos* est maternel, il est présent dans tout l'embryon après la fécondation, mais sa concentration est beaucoup plus importante dans le plasma germinatif (Forrest and Gavis, 2003; Wang et al., 1994). L'absence des protéines Nos et de son partenaire Pumilio, entraîne l'expression, au sein des PGC, de facteurs normalement somatiques et des défauts de développement (Asaoka et al., 1998; Deshpande et al., 1999; Kobayashi et al., 1996; Lai et al., 2012). *pgc* semble nécessaire au « silencing » des cellules germinales (Deshpande et al., 2004; Martinho et al., 2004). Le gène code pour un ARN non codant, dont la présence est nécessaire à la survie des PGC (Nakamura et al., 1996) en se liant avec P-tefb (Positive Transcription Factor Elongation b) (Hanyu-Nakamura et al., 2008) qui a pour rôle d'activer l'ARN polymérase de type II impliqué dans les mécanismes d'élongation de la transcription



**Figure 2 : Modèle préformiste de la spécification des PGC chez la drosophile (A) et le poisson-zèbre (B).** Dans les deux cas de figure, on remarque la présence du plasma germinal (germ plasm) au début du développement. Les cellules qui incorporeront les éléments de ce plasma germinal pourront devenir les futures cellules germinales (Adapté de Updik-Strome 2015)

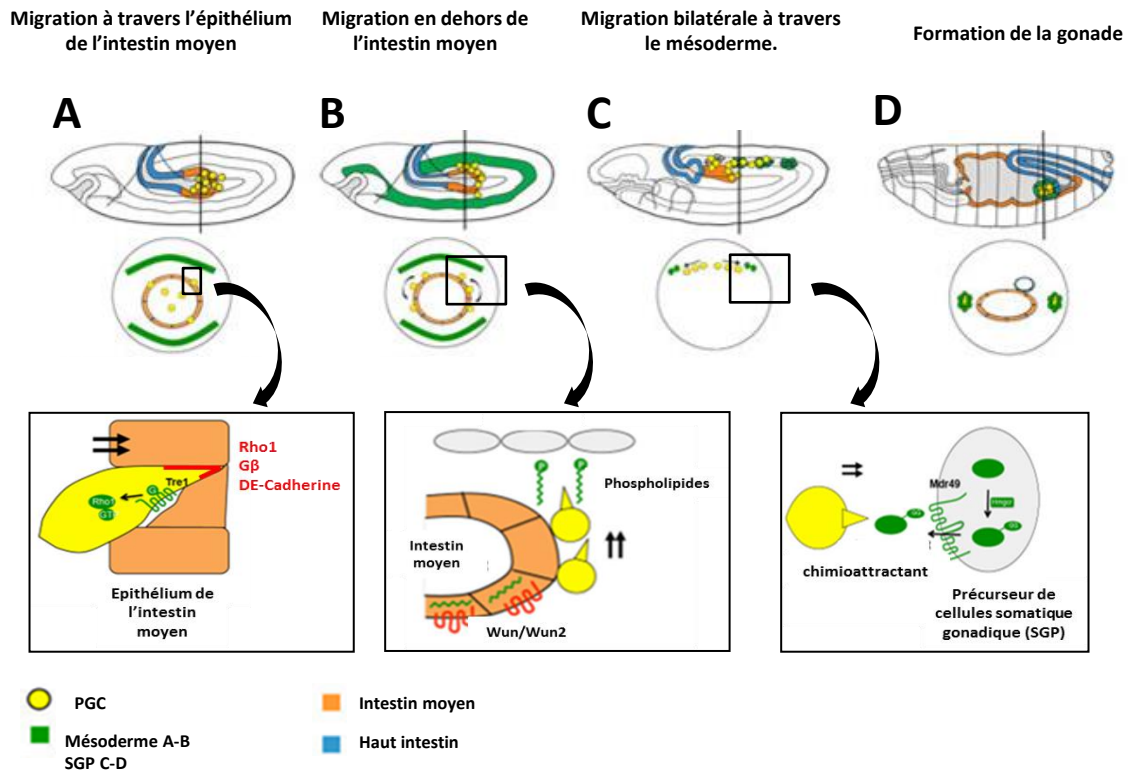
(Zhou et al., 2012). Si dans ce modèle c'est bien la présence du plasma germinatif qui entraîne initialement la spécification des cellules embryonnaires en cellules germinales, des études récentes montrent que la présence de voies de signalisation, comme la voie des BMPs, est aussi importante pour avoir un bon développement des cellules germinales chez la drosophile. En effet, en absence de BMP les cellules vont bien se spécifier en PGC mais elles vont avoir des difficultés à assembler le spectrosome qui est une organelle spécifique des cellules germinales. Ces cellules vont également perdre l'expression de gènes spécifiques des cellules germinales comme *vasa* (Deshpande et al., 2014).

Chez le poisson zèbre, les PGC se forment durant l'embryogenèse, environ 3h après la fécondation. Le mécanisme de spécification de ces PGC est encore peu connu mais il semble avoir de nombreux points en commun avec ce qui se passe chez la drosophile. Comme pour la drosophile, la mise en place du plasma germinatif est primordiale pour le bon développement de la future lignée germinale. Ainsi chez le poisson-zèbre, des mutations d'origine maternelle ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'éléments impliqués dans la formation et la localisation du plasma germinatif (figure 2). Son assemblage semble nécessiter la présence d'une protéine appelée Buckyball qui est retrouvée chez de nombreux vertébrés (Bontems et al., 2009). Sa localisation semble encadrée par Cea (cellular atol) une protéine du centrosome (Yabe et al., 2007) et Cei (cellular island) qui est liée à AuroraB une sérine/threonine kinases impliquée dans la régulation de la mitose et de la méiose (Yabe et al., 2009).

D'autres analyses, par l'utilisation de morpholino, ont permis de mieux identifier les composants et la fonction de ce plasma germinatif (figure 2). On retrouve comme chez la drosophile *Vasa* (Baat et al., 2000; Yoon et al., 1997), *Nanos 2* (Köprunner et al., 2001) et *Gcl* (Li et al., 2006). Mais on découvre aussi de nouveaux candidats comme *Dnd* (Weidinger et al., 2003a) et *Dazl* (Deleted in Azoospermia Like) (Li et al., 2016; Maegawa et al., 2002). Le rôle de ces facteurs semble conservé chez les poissons car des similitudes sont observées chez le médaka (Herpin et al., 2007; Li et al., 2016).

## **1.2. Migration des cellules germinales**

## Drosophile



**Figure 3 : Migration des PGC chez la drosophile (*D.melanogaster*).** **A** Migration transépithéliale à travers l'épithélium de l'intestin moyen après polarisation des cellules (Rho1, Gβ et DE-Cadherine) et activation de la voie Tre1. **B** régulation de la migration via les récepteurs Wun/wun2 qui permettent de capter les phospholipides et donc de maintenir un gradient en faveur des cellules cibles. **C** Attraction des PGC vers les précurseurs de cellules somatiques via la voie HmgcR réductase qui fixe sur un groupement geranyl-geranyl le chemoattractant sécrété via Mdr49 (multidrug resistance 49). **D** : formation de la gonade

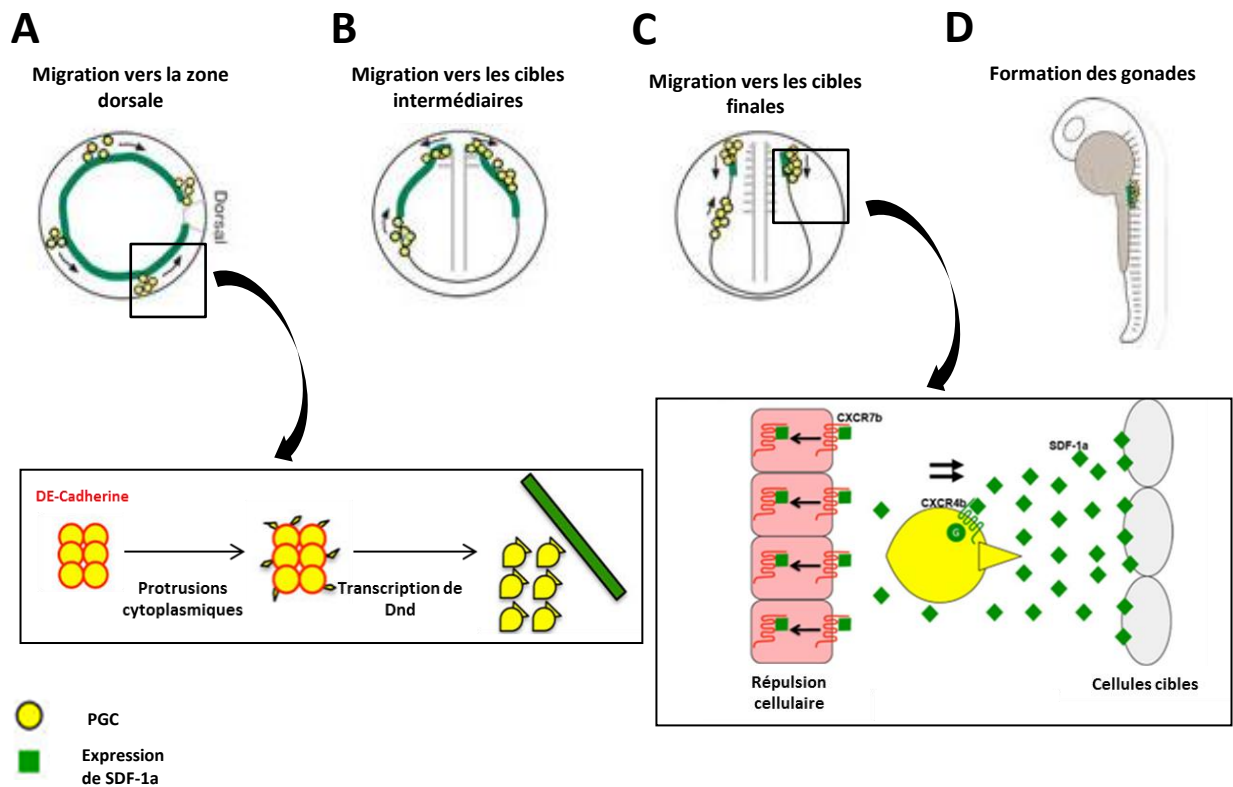
Une fois formées, les PGC vont devoir migrer à travers l'embryon afin de rejoindre le lieu de formation de la future gonade. Ce processus de migration va, en fonction des espèces, faire intervenir différents acteurs (figures 3, 4 et 5).

Chez la drosophile, les PGC vont subir une première migration dite passive. Suite à la mise en place de l'embryon et aux mouvements tissulaires, elles vont se retrouver sous forme de clusters dans la lumière de l'intestin moyen postérieur (4h après la ponte). Vers 4.5h après la ponte, un signal médié par un récepteur couplé à la protéine G, Tre1 (Kunwar et al., 2003, 2008), va entraîner la polarisation des PGC. On remarque que l'E-cadhérine (une protéine d'adhésion cellulaire), la Rho1 (une GTPase), et la G $\beta$  (protéine G beta) qui étaient uniformément réparties dans la membrane des cellules, vont s'accumuler pour former une sorte de queue cellulaire. Ce processus va entraîner une perturbation des jonctions cellulaires et un déplacement des PGC vers la paroi de l'intestin moyen qu'elles vont pouvoir traverser, toujours grâce à Tre1 (figure 3). Une fois en dehors, des phosphatases de l'acide phosphatidique, Wum et Wum 2 (Hanyu-Nakamura et al., 2004; Renault et al., 2004), localisées dans les PGC, pourraient consommer des phospholipides jouant le rôle d'attractant, attirant ainsi les cellules vers le mésoderme (Kunwar et al., 2006; Renault and Lehmann, 2006). Un autre mécanisme va alors prendre le relais, au niveau des cellules somatiques de la future gonade. Il fait intervenir HmgcoAR une hydroxyméthylglutaryl coenzyme A réductase (Van Doren et al., 1998b) qui est une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol, et dont l'activité est nécessaire à la formation du substrat Ggt1 (geranylgeranyl-transférase). Ce substrat est impliqué dans la prénylation des protéines. Il permettrait la modification post-traductionnelle d'un chimio-attractant qui une fois libéré via le transporteur ABC Mdr49 (multidrug resistance 49), pourrait permettre aux PGC de terminer leur migration au sein de la gonade (Ricardo and Lehmann, 2009).

Chez les poissons, l'analyse précise de la migration des PGC a été fortement facilitée par le marquage chromogénique ou fluorescent de composant du nuage comme les gènes *vasa* ou *nanos* (Krøvel and Olsen, 2002; Raz, 2003; Saito et al., 2006; Tanaka et al., 2001). Cette migration a été étudiée chez de nombreuses espèces de poissons comme *oryzias latipes*, *cyprinus carpio*, *barbus conchonus*, *micropterus salmonides*, *danio rerio* (Braat et al., 1999b) et reste très proche de ce



## Poisson-zèbre

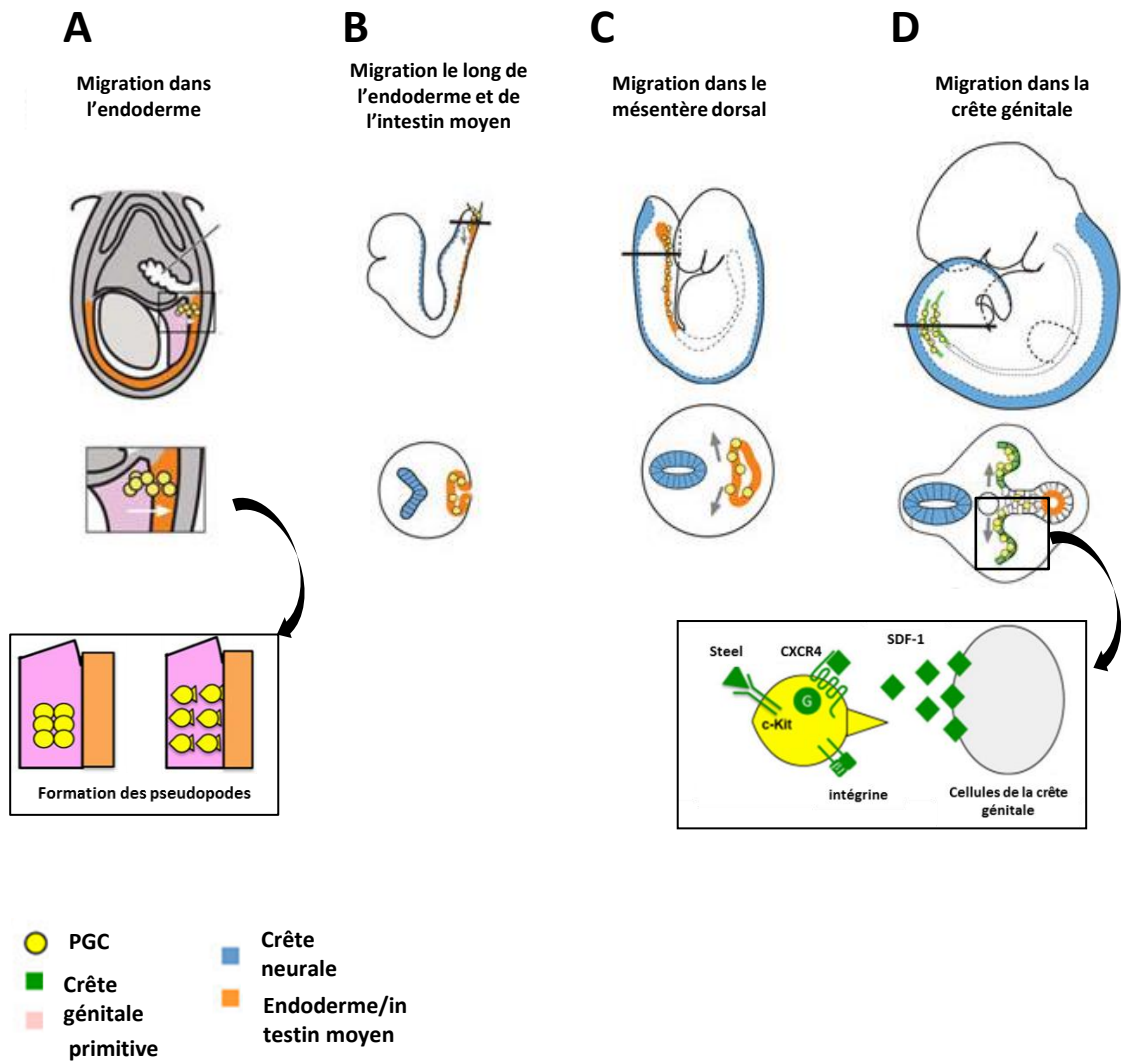


**Figure 4 : Migration des PGC chez le zebrafish (*Danio rerio*).** **A** Début de migration des PGC après formation des protrusions cytoplasmiques et perturbation des jonctions cellulaire cadhérine-dépendante suite à la transcription de *Dnd*. **B** et **C** migration des PGC dépendante d'un gradient de concentration de Sdf1a qui va attirer les PGC en se fixant sur Cxcr4b et être dégradé via Cxcr7b. **D** formation de la gonade. (adapté de Richardson and Lehmann, 2010)

qui est observé chez la souris et la drosophile (Raz, 2003; Richardson and Lehmann, 2010; Santos and Lehmann, 2004). La migration des cellules se fait par l'intermédiaire de pseudopodes, leur permettant de quitter l'endoderme pour rejoindre le mésentère dorsal puis la gonade primordiale (figure 4). Chez le poisson-zèbre, c'est 4.5h après la fécondation que les cellules commencent à migrer grâce à des protrusions cytoplasmiques. Cela est initié par une transcription de novo et l'activité de la protéine de liaison à l'ARN *dnd* (Blaser et al., 2005; Weidinger et al., 2003a). En effet, Dnd pourrait entraîner une baisse d'expression de l'E-cadhérine et donc une fragilisation des jonctions cellulaires permettant alors leurs individualisations et leurs déplacements (Weidinger et al., 2003a). Il a été aussi mis en évidence que Dnd inhiberait le mir430, permettant ainsi l'expression de gènes comme *nanos* et *tudor7*, mais le rôle de ces 2 gènes dans l'initiation de la migration reste inconnu (Kedde et al., 2007).

La migration des PGC chez le poisson-zèbre est longue et médiée principalement par le couple formé par la chemokine Sdf-1 (somal-derived-factor1), produite au niveau des cellules somatiques, et son récepteur couplé à la protéine G, Cxcr4b (C-X-C Motif Chemokine Receptor 4) qui est présent sur la membrane des PGC (figure 4). Pour éviter toute mauvaise migration des PGC, un autre récepteur appelé Cxcr7b est présent sur de nombreuses cellules de l'embryon. Ce récepteur va avoir pour rôle de dégrader rapidement Sdf-1 (Somal-Derived-Factor1) afin que le gradient de concentration de cette protéine attire bien les PGC vers la future gonade et non ailleurs (figure 4). Cette voie de régulation paracrine est hautement conservée chez de nombreux vertébrés comme les mammifères et les poissons (sériole, médaka, poisson-zèbre) (Doitsidou et al., 2002; Fernández et al., 2015; Knaut et al., 2003; Kurokawa et al., 2006; Mahabaleshwar et al., 2008; Molyneaux et al., 2003; Westernströer et al., 2015). Chez le poisson-zèbre, comme pour la drosophile, un autre mécanisme contrôlant la migration des PGC a été mis en évidence (Thorpe et al., 2004) dans lequel une hydroxyméthylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCoAR) joue un rôle clef. Enfin certains composants du nuage comme les ARN *nanos2*, *dnd*, *vasa* ou *Staufen1* et *Staufen2* semblent aussi importants puisque la production de KO pour ces gènes entraîne une mauvaise localisation des PGC et leur apoptose. (Köprunner et al., 2001; Li et al., 2009b; Ramasamy et al., 2006; Weidinger et al., 2003a).

## Souris



**Figure 5 : Migration des PGC chez la souris (*Mus musculus*).** A Migration des cellules dans l'endoderme après formation des pseudopodes, et orientation de la cellule. B, C et D migration des PGC via l'action de la voie Sdf1a/Cxcr4, de l'intégrine et du couple ligand récepteur Steel/c-Kit. (adapté de Richardson and Lehmann, 2010)

Chez la souris, une fois formées, les PGC vont se déplacer en utilisant des pseudopodes (Chiquoine, 1954; Ginsburg et al., 1990; McLaren, 1992) afin de rejoindre l'endoderme de l'intestin postérieur, puis le mésentère dorsal (9.5 post-fécondation) pour terminer leur migration au niveau des crêtes génitales à 10.5 jours post-fécondation (Molyneaux et al., 2001; Tam and Snow, 1981). L'initiation de la migration des PGC de souris semble être régulée par la protéine IFITM1 (interferon induced membrane proteine) (Tanaka et al., 2005), qui est une protéine présente à la surface de la cellule et qui est impliquée dans les mécanismes d'adhésions cellulaires (figure 5). Cependant, elle ne semble pas essentielle à cette fonction. Un orthologue de DND a également été impliqué dans l'initiation de la migration des PGC chez la souris mais sa fonction semble être plus liée à la survie des PGC qu'à leur migration (Youngren et al., 2005). Pour le moment la question de l'initiation de la migration des PGC reste entière chez la souris, mais les acteurs impliqués dans le déroulement de ce processus de migration sont similaires à ceux identifiés chez le poisson-zèbre. On a une expression de CXCR4 sur les membranes plasmiques des PGC, et une production de SDF-1 au niveau des crêtes génitales (Ara et al., 2003; Molyneaux et al., 2003). Toutefois d'autres éléments semblent importants dans la motilité des PGC comme STEEL et son récepteur à tyrosine kinase C-KIT (Gu et al., 2009; Runyan et al., 2006). De plus, le rôle de molécules d'adhésion semble aussi important, comme la cadhérine 93, l'intégrine 94, IFTIM3 et IFTIM1 (Lange et al., 2008; Tanaka et al., 2005). Le rôle de la HMGCAR a aussi été étudié chez les souris. L'utilisation d'inhibiteur de la HMGCAR sur des cultures organotypiques entraîne l'apoptose des cellules germinales et somatiques, mais ne semble pas affecter la migration des PGC *in vitro* (Ding et al., 2008). A l'inverse, des études montrent que le couple ligand/récepteur WNT5A/ROR2 semble avoir un rôle important dans cette migration des PGC (Chawengsaksophak et al., 2012; Laird et al., 2011) (figure 5).

Après leur arrivée dans les futures gonades, les PGC seront appelées gonocytes. Elles ne montreront que peu de modifications lors du développement gonadique et *in fine* elles donneront chez le mâle des cellules spermatogoniales qui pourront alors initier le processus de spermatogenèse.

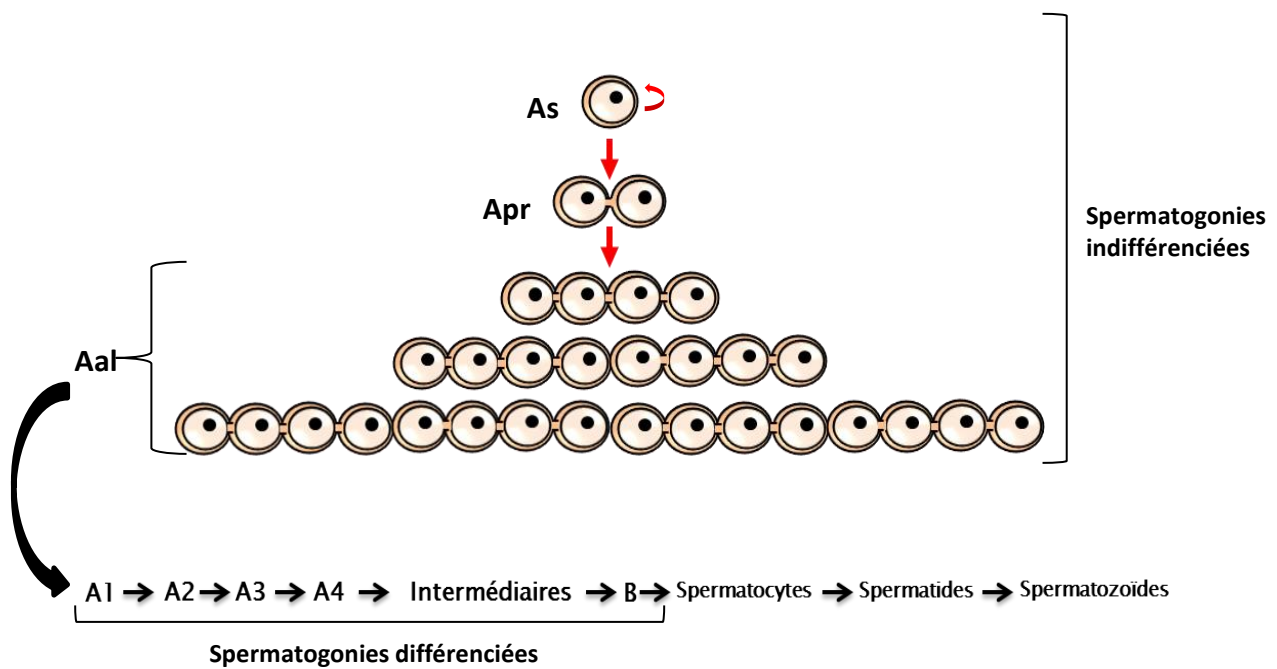
## **2. La spermatogenèse**

La spermatogenèse est un processus de multiplication et de différenciation cellulaire complexe qui est initié peu après la naissance chez les mammifères ou après le développement larvaire chez les insectes et les poissons. Il permet la formation d'une multitude de spermatozoïdes haploïdes à partir de cellules germinales diploïdes appelées cellules souches spermatogoniales (Spermatogonial Stem cell : SSC) (voir chapitre IV). Les premières études de ce processus remontent au 19<sup>ème</sup> siècle avec les travaux d'un biologiste allemand, Albert von Kölliker (1854). Depuis, les études n'ont cessé de se multiplier et ont permis de mettre en évidence les 3 grandes étapes de la spermatogenèse. La première, la phase spermatogonale, comprend les différentes générations de spermatogonies incluant les cellules souches et les spermatogonies différenciées. La deuxième est la phase spermatocytaire regroupant les spermatocytes primaires et secondaires. Enfin, la dernière est appelé spermiogénèse. Elle correspond à l'émergence de spermatides (via des divisions méitotique) qui se différencieront en spermatozoïdes

Les modifications cellulaires et génétiques des cellules germinales souches qui interviennent au cours de la spermatogenèse sont relativement bien conservées chez les vertébrés (Miura et al., 2003; Pudney, 1995; Roosen-Runge, 1969; Schulz et al., 2010a) même si chez les poissons la durée de la spermatogenèse est habituellement plus courte et peut être influencée par de nombreux éléments extérieurs comme la température, le pH ou la densité de population des poissons (Nóbrega et al., 2009).

### **2.1. Les spermatogonies A et B**

Les différentes populations de spermatogonies observées dans les testicules ont été très bien étudiées, notamment, chez les rongeurs. Les spermatogonies sont situées dans le compartiment basal du tube séminifère et elles restent en contact avec la lame basale. Elles sont classées en 3 types distincts, principalement sur le critère de la quantité croissante d'hétérochromatine présente dans le noyau. On retrouve donc les spermatogonies de type A, les spermatogonies intermédiaires et les spermatogonies B (Oakberg, 1971; de Rooij and Griswold, 2012; de Rooij and



**Figure 6 : Représentation schématique de la spermatogenèse chez la souris.** Les cellules A seules ( $A_s$ ), A en paires ( $A_{pr}$ ) et A alignées ( $A_{al}$ ) forment le groupe des spermatogonies A indifférenciées. Les  $A_{pr}$  se différencieront en spermatogonies A différenciées (de  $A_1$  à  $A_4$ ) qui donneront les spermatogonies intermédiaires puis B qui entreront en méiose pour former au final les spermatozoïdes.

Russell, 2000). Dans les spermatogonies A, on va retrouver deux grandes catégories. La première catégorie regroupe les spermatogonies indifférenciées qui comprennent des spermatogonies isolées ( $A_s = A$  seule), les spermatogonies en doublet ( $A_{pr} = A$  en paires) et les spermatogonies alignées ( $A_{al}$  chaînes de 4 à 16 cellules). Les cellules  $A_s$  sont constamment présentes dans le tubule séminifère de la souris et elles sont capables de s'auto-renouveler. L'autre catégorie de spermatogonies A, dites différenciées et nommées de  $A_1$  à  $A_4$ , ne sont visibles qu'à des stades bien particuliers dans l'épithélium séminifère. Elles donneront naissance aux spermatogonies dites intermédiaires, appelées ainsi par la quantité intermédiaire d'hétérochromatine qu'elles possèdent. Ce sont ces cellules qui donneront naissance aux spermatogonies B, qui pourront alors initier une méiose (figure 6) (Oakberg, 1971; de Rooij and Griswold, 2012; de Rooij and Russell, 2000).

Chez les poissons de nombreuses études ont aussi été réalisées sur différentes espèces (Billard, 1986; Grier et al., 1978; Schulz et al., 2010a). Malheureusement il est parfois difficile de comparer les données de par l'existence d'une nomenclature qui varie beaucoup en fonction des espèces (figure 7), comme le poisson-zèbre, la truite ou encore la roussette (Bosseboeuf et al., 2014; Loir, 1999a; Schulz et al., 2010a). Afin de faciliter la compréhension et la comparaison des données inter-espèces, et étant donné que le processus spermatogénétique reste assez similaire entre les espèces, il a été proposé d'adapter la nomenclature utilisée chez les rongeurs aux poissons (Schulz et al., 2010a). Chez les poissons osseux, une réserve de spermatogonies est présente, au niveau de l'épithélium germinale, toute la vie de l'individu. Ces spermatogonies sont appelées spermatogonies A indifférenciées. Ce sont des cellules diploïdes, capables de s'auto-renouveler (figure 7). Ce sont les cellules germinales les plus grandes de la lignée germinale avec un rapport nucléocytoplasmique faible et un diamètre cellulaire compris entre 12 et 16  $\mu\text{m}$ . Ces cellules contiennent un cytoplasme granulaire léger et un noyau sphérique en position centrale qui va présenter une chromatine granuleuse avec un nucléole peu fragmenté. Le cytoplasme contient des mitochondries classiques mais arrondies avec de nombreux petits cristaux vésiculaires. Les spermatogonies A indifférenciées vont subir une première division mitotique qui conduira à la production de spermatogonies A différenciées. Ces spermatogonies ont un noyau rond qui va s'ovaliser et présenter un nucléole mono ou bilobé. La quantité de matériel du nuage



Truite: *Oncorhynchus mykiss*

$A1 \rightarrow A2 (2) \rightarrow B1 (2) \rightarrow B2 (4) \rightarrow B3 (8) \rightarrow B4 (16) \rightarrow B5 (32) \rightarrow B6(64) \rightarrow$  Spermatocytes  $\rightarrow$  Spermatides  $\rightarrow$  Spermatozoïdes.  
 (Loir et al 1999)

Spermatogonies différenciées

Spermatogonies indifférenciées



Roussette: *Scyliorhinus canicula*

$As \rightarrow Ap \rightarrow Au4 \rightarrow Au8 \rightarrow Au16 \rightarrow Au32 \rightarrow Au64 \rightarrow Au128 \rightarrow Au256 \rightarrow Au512 \rightarrow Ad1 \rightarrow Ad2 \rightarrow Ad4 \rightarrow Ad8 \rightarrow$  Spermatocytes  $\rightarrow$  Spermatides  $\rightarrow$  Spermatozoïdes.  
 (Bosseboeuf et al., 2014)

Spermatogonies indifférenciées

Spermatogonies différenciées



Zebrafish: *Danio rerio*

$A_{ind} \text{ et } A_{ind}^* \rightarrow Adiff1 \rightarrow Adiff2 \rightarrow Adiff3 \rightarrow B1 \rightarrow B2 \rightarrow B3 \rightarrow B4 \rightarrow B5 \rightarrow$  Spermatocytes  $\rightarrow$  Spermatides  $\rightarrow$  Spermatozoïdes.  
 (Leal et al, 2010)

Spermatogonies indifférenciées

Spermatogonies différenciées

**Figure 7 : Représentation schématique de la spermatogenèse chez différentes espèces de Poissons.** Les spermatogonies A indifférenciées génèrent des spermatogonies différenciées qui seront à l'origine de spermatogonies B qui après plusieurs mitoses entameront le processus de division méiotique pour donner au final des spermatozoïdes. Notez que le groupe des spermatogonies indifférenciées est plus ou moins restreint aux cellules isolées selon les espèces.

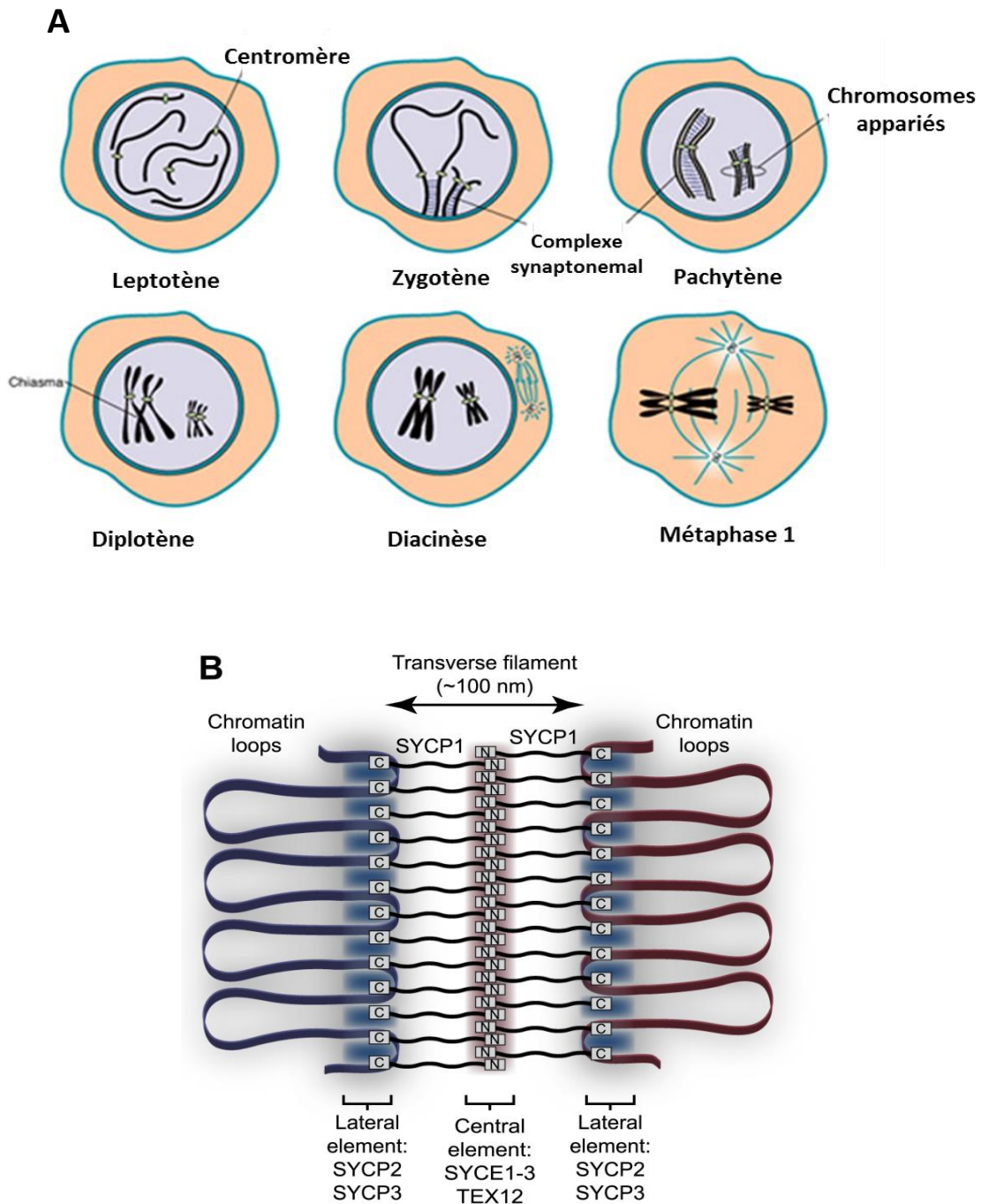


semble diminuée dans le cytoplasme. Chez le poisson-zèbre, on retrouve deux types de spermatogonies indifférenciées, on ne sait pas encore pour le moment si ce sont des cellules réellement différentes ou si ce sont les mêmes cellules observées à des étapes différentes du cycle cellulaire. Toujours chez le poisson-zèbre, les spermatogonies A qui montrent les tout premiers signes d'une différenciation cellulaire, seront retrouvés dans des clusters de 2 jusqu'à 8 cellules (figure 7). Ensuite, on retrouve la population de spermatogonie B, qui à l'inverse de ce qui est trouvé chez les mammifères ne représente pas la dernière étape avant la différenciation méiotique puisque ces spermatogonies B vont subir plusieurs cycles de division mitotique selon les espèces avant de rentrer en méiose (figure 7). Les caractéristiques morphologiques qui distinguent les spermatogonies B des spermatogonies A restent mal définies comme en témoignent les différentes nomenclatures proposées chez les poissons. D'autre part, le nombre de cycles de mitoses des cellules spermatogoniales varie selon les espèces (figure 7). Il existerait 14 générations de spermatogonies chez le guppy (Billard and Escaffre, 1970), 9 chez le poisson-zèbre (Leal et al., 2009a), et 6 chez la truite (Loir, 1999a). Au cours de ces cycles de division, les diamètres cellulaire et nucléaire des spermatogonies B diminuent progressivement mais le rapport nucléocytoplasmique augmente. Le noyau va également contenir de plus en plus d'hétérochromatine qui se concentre en périphérie de la membrane nucléaire ou en amas au sein du noyau pour former des chromocentres.

## **2.2. Les cellules méiotiques.**

La méiose consiste en deux divisions cellulaires successives qui aboutissent à la production de quatre spermatides haploïdes à partir de spermatogonies différenciées de type B. La première division de méiose dite réductionnelle passe par la formation de spermatocytes primaires qui restent des cellules sphériques avec un diamètre de huit à douze micromètres. Les spermatocytes primaires sont majoritairement observés lors de la prophase de la première division méiotique. Cette prophase est lente et subdivisée en 5 stades, leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse (figure 8).

Durant la phase leptotène, les chromosomes sont dupliqués et commencent à se condenser. Il y a apparition de noyaux axiaux aux extrémités des chromosomes,



**Figure 8 : A. les différentes étapes de la prophase de première division méiotique.** Leptotène début de compaction de la chromatine et apparition des centromères. Zygotène, début d'appariement des chromosomes homologues via la formation du complexe synaptonémal. Pachytène le complexe synaptonémal est formé et les chromosomes sont appariés. Diplotène, apparition de chiasma entre les brins des chromosomes homologues (crossing over). Diacinèse, alignement des chromosomes, via leur centromère, au centre de la cellule. Métaphase 1, séparation des chromosomes homologues. **B. Schéma détaillé d'un complexe synaptonémal.** On retrouve Sycp2 et 3 au niveau des noyaux axiaux, et Sycp1 dans la composition de l'élément central. (adapté de Syrjänen et al., 2014)

proche de la membrane nucléaire. Au stade zygotène, ces noyaux axiaux, appelés aussi éléments latéraux, vont être connectés par des filaments transverses qui formeront un élément central. Tous ces éléments font partie du complexe synaptonémal (figure 8). Ce complexe est un élément important car il va pouvoir permettre un début d'appariement des chromosomes homologues. Il est composé d'éléments latéraux formés de SYCP2 et 3 (Synaptonemal Complex protein 2 et 3) (Dobson et al., 1994; Lammers et al., 1994; Syrjänen et al., 2014) et d'un élément central composé de SYCE1-3 (Synaptonemal Complex Central Element Protein 1 et 3) et TEX12 (Testis expressed 12) (Bolcun-Filas et al., 2007; Costa et al., 2005; Davies et al., 2012; Hamer et al., 2006). Ces deux éléments sont reliés par SYCP1 (Meuwissen et al., 1992). Au stade pachytène, la condensation des chromosomes est presque terminée et le complexe synaptonémal est totalement formé. C'est durant cette phase qu'apparaîtront des nodules de recombinaison appelés aussi chiasma, permettant le crossing-over, et donc l'échange de régions génomiques entre les chromosomes paternels et maternels. Ensuite on arrive au stade diplotène, qui voit disparaître le complexe synaptonémal, mais pas les nodules de recombinaison. Les télomères se détachent de la membrane nucléaire. On rentre alors en diacynèse, qui marque la fin de la prophase 1 et la transition vers la métaphase 1. Ce processus fait aussi intervenir des gènes comme *Vasa* et *Dazl* qui semblent nécessaires au bon déroulement de la méiose (Saunders et al., 2003).

Les spermatocytes primaires vont ensuite entrer en métaphase, anaphase et télophase pour produire *in fine* des spermatocytes secondaires qui ne contiendront qu'un seul jeu de chromosomes mais avec une chromatine dédoublée. Les spermatocytes secondaires sont des cellules bien plus petites, de quatre à sept micromètres. Elles sont sphériques avec un noyau central arrondi et des chromosomes filamenteux prêts à entrer immédiatement en deuxième division méiotique dite équationnelle qui conduira à la séparation des deux chromatides sœurs et à la formation de deux spermatides à partir d'un spermatocyte secondaire.

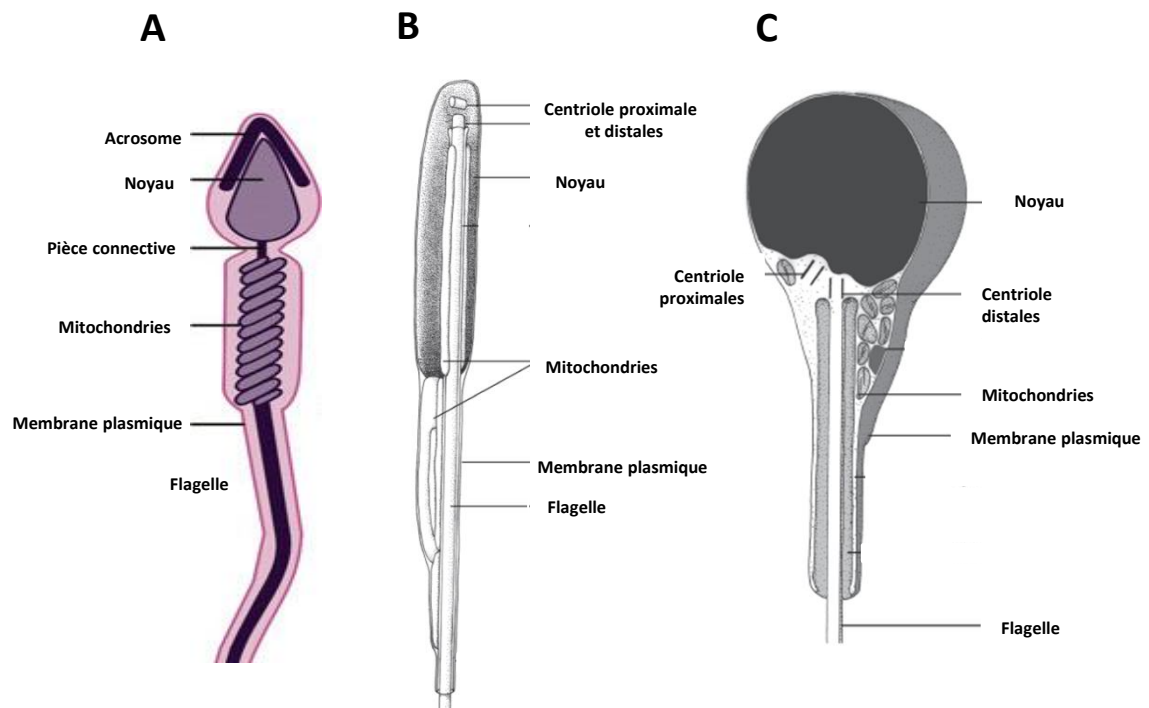
### **2.3. Les cellules post-méiotiques**

Les spermatides haploïdes sont des cellules de petite taille, entre deux et quatre micromètres, sphériques avec un noyau rond au début de leur apparition. Ces cellules ne se divisent plus mais subissent de nombreuses transformations

morphologiques qui les transformeront en spermatozoïdes. Ce processus est appelé spermiogenèse. Durant la spermiogenèse le noyau des spermatides devient plus petit et parfois plus ou moins allongé selon les espèces. La chromatine devient plus condensée. Chez les mammifères, une grande partie des composants du cytoplasme, devenus inutiles, vont être progressivement éliminés, d'abord sous la forme de corps résiduels qui seront phagocytés par les cellules de Sertoli, puis sous la forme de gouttelettes cytoplasmiques qui migrent le long du flagelle lors du transit épидидymaire des spermatozoïdes. Lors de l'élimination du cytoplasme, les mitochondries vont s'accumuler principalement au niveau de la pièce intermédiaire de la tête. L'une des modifications morphologiques majeures intervenant au cours de la spermiogenèse est la formation du flagelle. C'est une structure ciliée qui va se développer à partir de l'un des deux centrioles de la spermatide. La structure axonale est composée de 9 doublets de microtubules périphériques et le plus souvent d'une paire de microtubules centrale. Certaines espèces notamment de la famille des cetopsidés peuvent présenter deux flagelles (Spadella et al., 2006). Les flagelles sont indispensables à la mobilité des spermatozoïdes (figure 9).

Une autre modification morphologique importante est la formation d'un acrosome qui va se positionner au niveau de la tête des spermatozoïdes et recouvrir le noyau. Cette structure fonctionnelle de type lysosome contient de nombreuses enzymes lysosomiales capables de digérer la zone pellucide qui protège les ovocytes. Contrairement à d'autres poissons osseux comme l'esturgeon (Hatef et al., 2012), les poissons téléostéens ne possèdent pas d'acrosome. Les spermatozoïdes pénètrent le chorion pour atteindre la membrane de l'ovocyte grâce à une sorte de canal appelé micropyle (Iwamatsu et al., 1997; Ohta and Iwamatsu, 1983).

La structure et la taille des spermatozoïdes varient considérablement en complexité en fonction des espèces, quel que soit le groupe taxonomique considéré. Chez les poissons, les spermatozoïdes sont classifiés en fonction du mode de fécondation interne ou externe : on parlera alors d'aqua sperme ou d'intro sperme respectivement (Jamieson and Leung, 1991). L'aqua sperme est isodiamétrique avec une tête globulaire alors que l'intro sperme est anisodiamétrique avec une tête allongée (figure 9). À la fin de la spermatogenèse quand les ponts intercellulaires sont cassés et que les spermatozoïdes sont individualisés, les complexes de jonction



**Figure 9. Comparaison de la structure des spermatozoïdes entre les mammifères et les poissons téléostéens.** On note de grandes similitudes, mais aussi une différence notable comme l'absence d'acrosome au niveau des spermatozoïdes de poissons téléostéens. **A** : spermatozoïde de souris **B** : intro-spermatozoïde **C** : Aqua-spermatozoïde.

entre les cellules de Sertoli formant le cyste vont être remodelés afin de permettre son ouverture et la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tubule séminifère. Il n'y a pas de preuve chez les poissons que cette relâche des spermatozoïdes soit facilitée par les cellules musculaires ou par le cytosquelette des cellules de Sertoli.

Si le processus de spermatogenèse reste assez similaire chez les vertébrés, la structure et l'organisation du testicule peut lui être assez variable selon les espèces d'un même groupe taxonomique.

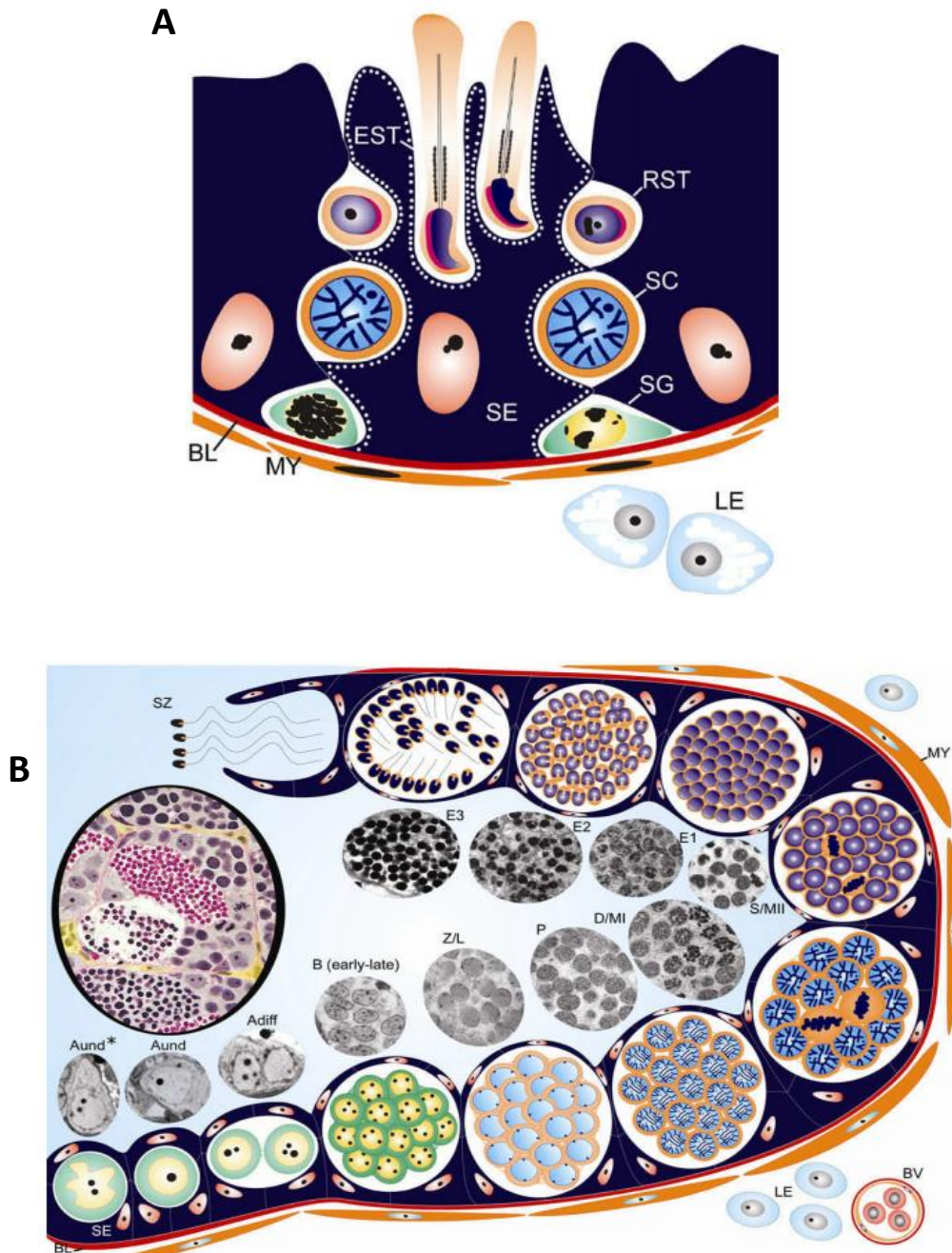
### **3. Structure et organisation du testicule chez les poissons adultes**

#### **3.1. Structure**

Chez les vertébrés, le testicule est protégé par l'albuginée, une enveloppe épaisse et résistante de tissu conjonctif qui peut se prolonger vers l'intérieur de la glande pour former des septums. Le testicule contient deux compartiments, le compartiment interstitiel et le compartiment séminifère. Le compartiment interstitiel est retrouvé tout autour des tubes séminifères et il est composé de cellules de Leydig (stéroïdogènes), de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de macrophages, de mastocytes et enfin de tissus nerveux. Le compartiment interstitiel est séparé du compartiment séminifère par une lame basale sécrétée par les cellules myoïdes appelées également cellules péritubulaires et les cellules de Sertoli. Le compartiment séminifère est délimité par les cellules de Sertoli qui forment un épithélium favorable à la survie et au développement des cellules germinales qui s'y sont ancrées (Koulisch et al., 2002). L'organisation de cet épithélium germinal va varier en fonction des espèces, en deux patrons distincts (figure 10).

##### **3.1.1. Anamniotes**

Chez les anamniotes (poissons, amphibiens), on observe une organisation dite cystique (Engel and Callard, 2007). Le cyste également appelé spermatocyste apparaît clairement lorsqu'une cellule de Sertoli vient entourer complètement un groupe de cellules spermatogoniales (figure 10). Les cellules à l'intérieur du cyste



**Figure 10 : Comparaison entre l'organisation d'un testicule de Souris (A) et de poissons zèbres (B).** La différence importante entre ces deux modèles est la relation existante entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. En **A** c'est une organisation non cystique, la cellule de Sertoli soutient plusieurs cellules germinales à des stades de développement précis, mais différents. BL (membrane basale) ; MY (cellules péritubulaires myoïdes) ; LE (cellules de Leydig) ; SE (cellules de Sertoli) ; SG (Spermatogonie) ; SC (Spermatocyte) ; RST (spermatide rond) ; EST (spermatide allongé).

En **B** c'est l'organisation cystique, la cellule de Sertoli vient entourer une cellule spermatogoniale indifférenciée. Les divisions et la différenciation de cette spermatogonie indifférenciée auront lieu à l'intérieur de ce cyste. Aund\* (spermatogonie A indifférenciée \*) ; Aund (spermatogonie A indifférenciée) ; A diff (spermatogonie A différenciée) ; B (spermatogonie B) ; Z/L (spermatocytes aux stades zygotène /leptotène ; P (spermatocytes au stade pachytène) , D/MI (spermatocyte au stade diplotène/métaphase 1) ; S/MII (spermatocyte secondaire et métaphase 2) ; E1 (Spermatide précoce) ; E2 (spermatides intermédiaire) ; E3 (spermatides allongés) ; SZ (spermatozoïdes). (adapté de Schultz et al., 2010)

resteront toutes inter-connectées par un pont cytoplasmique, permettant ainsi leur division synchrone. Contrairement aux observations réalisées chez les mammifères, le nombre de cellules de Sertoli augmente au cours de la spermatogenèse pour s'adapter à l'augmentation du nombre de cellules dans le cyste (Schulz et al., 2005). Les cellules de Sertoli vont former au moment de méiose une barrière hémato-tissulaire autour des cellules germinales en différenciation. A la fin de la spermatogénèse le cyste va se rompre pour libérer les spermatozoïdes dans la lumière du tubule. (Pudney, 1995).

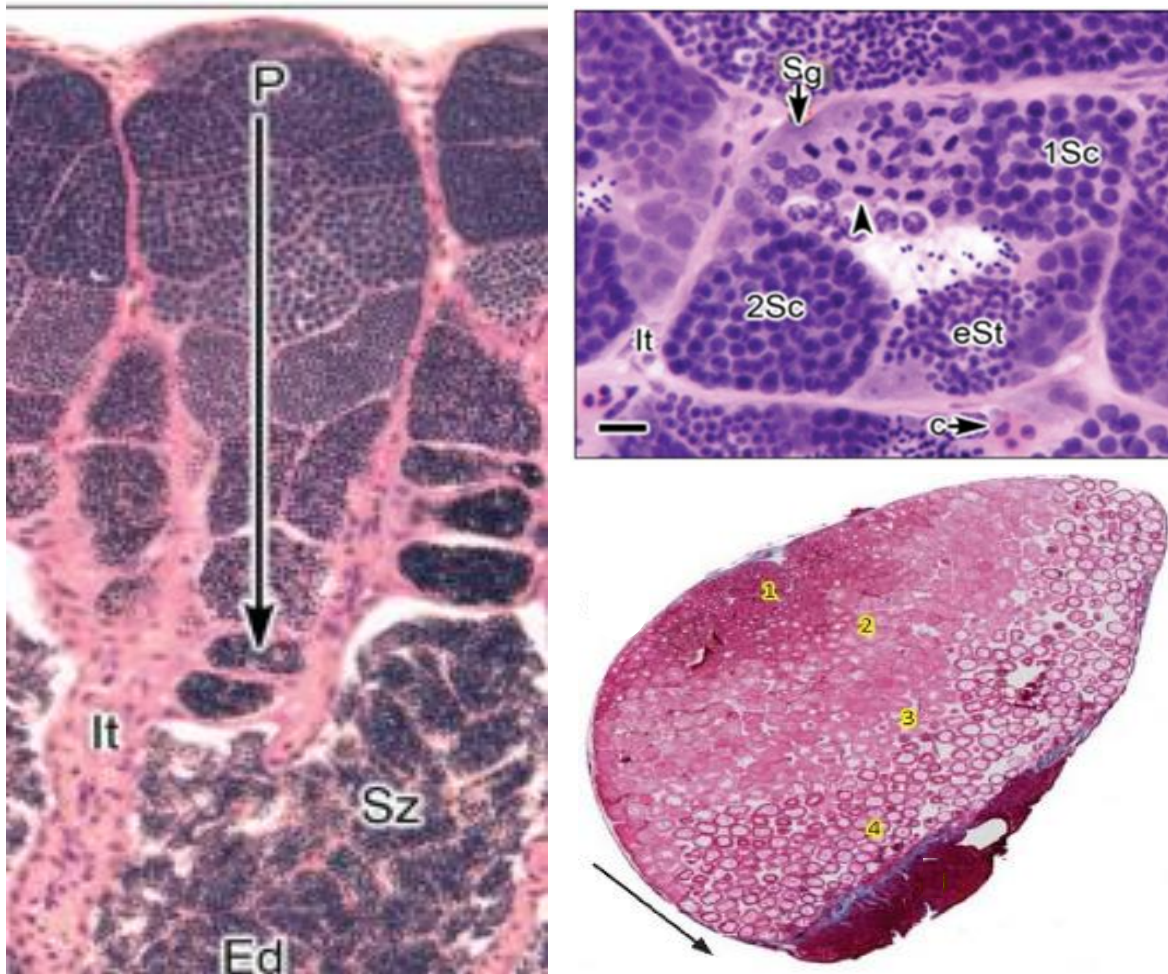
### **3.1.2. Amniotes**

Chez les amniotes (mammifères, reptiles, oiseaux), il n'y a pas formation de cystes. On retrouve une population de cellules de Sertoli permanente, « immortelle » qui va pouvoir soutenir plusieurs cellules germinales à des stades de développements précis mais différents. L'organisation des cellules germinales est supportée par une cellule de Sertoli et elle suit une répartition très ordonnée (figure 10). On retrouve les spermatogonies en position basales, puis les spermatocytes et enfin les spermatides et spermatozoïdes en position adluminale (Roosen-Runge, 1969). La description de l'organisation tridimensionnelle de l'épithélium séminifère a permis de montrer que les étapes de la spermatogenèse progressent le long des tubes séminifères formant ainsi des vagues spermatogénétiques qui s'enchaînent régulièrement le long des tubes séminifères (Clermont and Bustos-Obregon, 1968).

### **3.2. Organisation du testicule**

Dans la majorité des espèces on va retrouver une organisation des tubes séminifères dite orientée. Chez la drosophile ou le nématode *Caenorhabditis elegans*, les spermatogonies indifférenciées sont retrouvées à l'extrémité distale du tube séminifère appelée HUB et elles vont se différencier au fur et à mesure qu'elles s'éloignent de cette « niche germinale » pour enfin être expulsées sous forme de spermatozoïdes dans la lumière et à l'extrémité du tube séminifère (Roosen-Runge, 1969). Chez les mammifères et les poissons téléostéens (Grier et al., 1978; Uribe et al., 2014), c'est un peu plus complexe, puisque nous retrouverons 3 types d'organisations différents, qualifiés de Restreinte, Non-Restreinte et Mixte (figure 11).





**Figure 11 : Modèles d'organisations testiculaires chez les poissons. A. Testicule restreint chez *Goodea atripinnis* :** Le testicule est composé de plusieurs tubules dont les cystes les plus différenciés sont retrouvés au plus proche du canal efférent. Le gradient de différenciation est orienté de la périphérie (P) vers le canal efférent (ED) (Fleche) ou l'on retrouve des spermatozoïdes (Z). (IT: tissu intersticiel). **B. Testicule non restreint chez *Centropus undecimalis* :** Il y a différenciation progressive des spermatogonies le long de la paroi des tubules sans réelle organisation. Spermatogonie (Sg) ; Spermatocytes primaires (1Sc); Spermatocytes primaires en division méiotique (flèche) ; Spermatocytes secondaires (2Sc), Spermatides précoces (eST), spermatides tardifs (IST) ; capillaires (c) ; tissu intersticiel (It). **C. Testicule intermédiaire chez *Scyliorhinus canicula* :** On retrouve une zone germinative avec des spermatogonies indifférenciées (1), des spermatocytes primaires et secondaires (2) , des lobules à spermatides (3) et des spermatides tardives ou des spermatozoïdes (4). (adapté de Uribe et al., 2014)

### **3.2.1. Type Restreint**

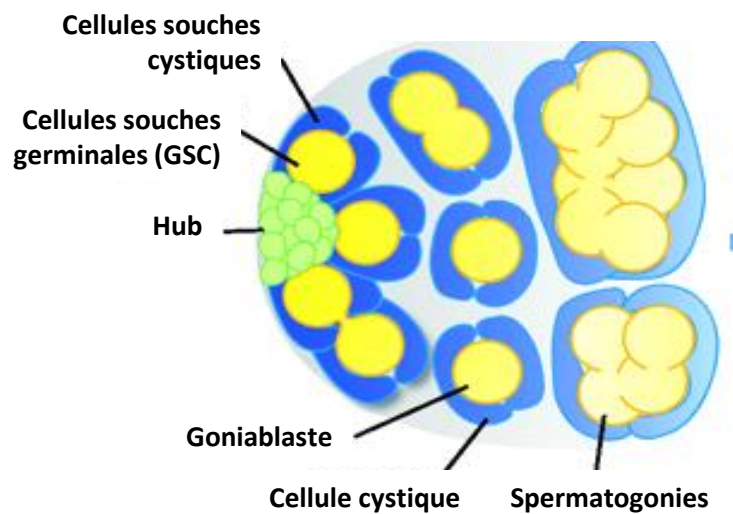
La région distale du compartiment germinal, proche de la lame basale, est occupée par des cellules de Sertoli qui entourent la population de cellules spermatogoniales indifférenciées. Lorsque les divisions commencent et en fonction de l'état de différenciation des cellules germinales, le cyste primaire va se déplacer jusqu'au canal spermatique qui se trouve au centre du testicule, où il y a spermiation, c'est-à-dire ouverture du cyste qui entraîne la libération des spermatozoïdes. Ce type d'organisation, qui est représenté sur la figure 11, est retrouvé principalement chez les Athériniformes, Cyprinodontiformes et Béloniformes (Parenti and Grier, 2004).

### **3.2.2. Type Non restreint**

Les spermatogonies sont retrouvées accolées à la lame basale et réparties de manière apparemment aléatoire tout le long des tubes séminifères (figure 11), même si certaines études démontrent une présence préférentielle des cellules spermatogoniales précoces dans une zone proche du tissu interstitiel et des vaisseaux sanguins (Nóbrega et al., 2010a). Le cyste qui se forme ne migre pas, la différenciation spermatogénétique progressera à l'intérieur de ce cyste qui au final s'ouvrira pour libérer les spermatozoïdes. On retrouve cette organisation chez les Cypriniformes, Characiformes et les Salmoniformes (Parenti and Grier, 2004).

### **3.2.3. Type Intermédiaire**

Il est aussi possible d'avoir une sorte de mélange des deux organisations précédentes. Les spermatogonies indifférenciées se retrouvent dans une zone spécifique du testicule. Chez la roussette les progéniteurs de cellules germinales et de cellules de Sertoli vont proliférer au niveau d'une zone spécifique appelée zone germinative (Almeida et al., 2008; Bosseboeuf et al., 2014). En même temps que ces cellules prolifèrent elles vont quitter la zone germinative et commencer à former des cystes. Les cystes nouvellement formés pousseront les cystes plus différenciés en périphérie. On retrouvera alors une compartimentalisation cellulaire du testicule avec les stades précoces en périphérie et les stades plus tardifs proches du canal spermatique (figure 11).

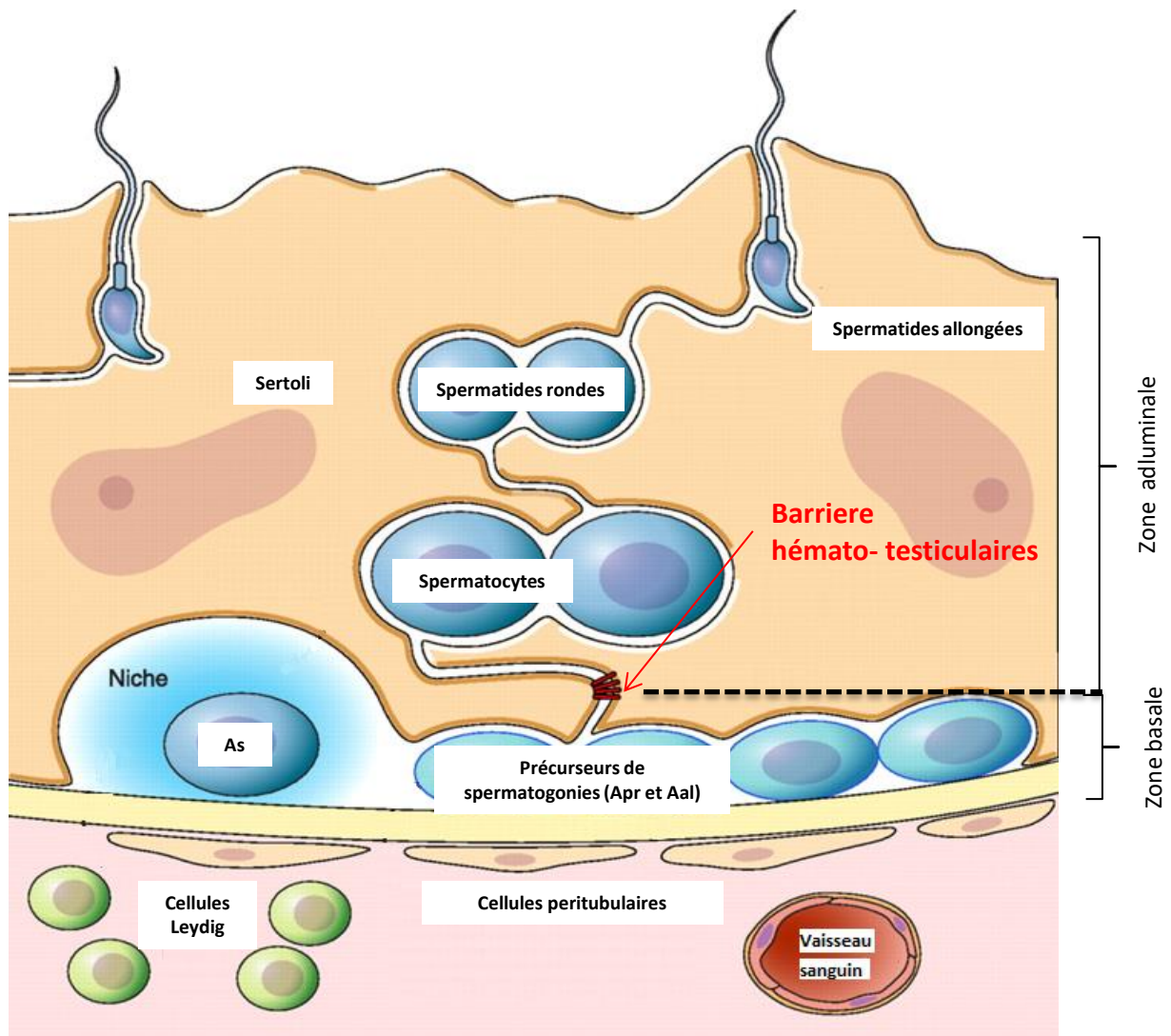


**Figure 12 : Niche germinale chez la drosophile.** Les cellules stromales du HUB (Vert) sont localisées au niveau de l'extrémité apicale du testicule. Les cellules germinales souches (Jaune) sont en contact avec les cellules du HUB et entourées par deux cellules souches cystiques (Bleu), elles même en contact avec le Hub. Les cellules germinales souches (GSC) vont se diviser de manière asymétrique pour former un doublet composé d'une GSC et d'un goniablaste interconnectés par un pont cytoplasmique et entouré de cellules cystiques. Après rupture du pont cytoplasmique, le goniablaste se différenciera en spermatogonies différenciées. Adapté de (Cuevas et Matunis, 2011)

#### **4. Notion de niche germinale**

La notion de niche apparaît pour la première fois en 1978. Il est mis en avant que la capacité d'une cellule à être souche ne dépendrait pas uniquement de la cellule souche elle-même, mais de l'impact de l'environnement cellulaire proche de la cellule souche (Schofield, 1978). Deux notions de niche peuvent être distinguées. Une notion cellulaire, où les différents types cellulaires présents dans la niche vont, par leur contact privilégié, induire des contraintes spatiales agissant sur le caractère souche de la cellule (Morrison and Spradling, 2008). La deuxième notion est plutôt acellulaire, puisqu'elle met en jeu des molécules comme la matrice extracellulaire, qui pourraient permettre de concentrer certains facteurs de régulation sécrétés afin de créer un environnement propice à la survie et à la prolifération des cellule souches cibles (Annes et al., 2003; Inaba et al., 2016). De plus, il ne faut pas non plus négliger les variables physiques comme le pH ou l'apport en oxygène, etc...(Adams et al., 2006; Bautch, 2011; Chaudhry et al., 2008; Wagers, 2012). La notion de niche est largement répandue dans les tissus des animaux adultes. Ainsi de nombreuses études ont permis d'identifier la niche des cellules souches hématopoïétiques (Adams and Scadden, 2006), musculaires (Dhawan and Rando, 2005), du système pileux (Blanpain and Fuchs, 2006) ou encore du système nerveux central (Doetsch, 2003; Pour revue : Li and Xie, 2005; Morrison and Spradling, 2008).

Chez les invertébrés comme la drosophile, la niche des cellules souches germinales se trouve à l'extrémité apicale du testicule. Elle est composée de trois types cellulaires distincts. Il y a des cellules du HUB, les cellules souches germinales (GSC) et les cellules cystiques germinales (CySC). Les cellules du Hub sont des petites cellules qui vont former un amas cellulaire à l'extrémité du testicule. En contact direct avec ces cellules du HUB, on peut retrouver entre 6 et 9 GSC. Ce sont des cellules arrondies, avec un gros noyau. Autour de ces GSC il y a 2 CySC, qui vont se lier aux cellules du HUB (Cuevas and Matunis, 2011). Les contacts entre ces 3 types cellulaires et leur répartition sont des éléments très importants qui vont jouer un rôle dans la régulation des voies de signalisation (figure 12).



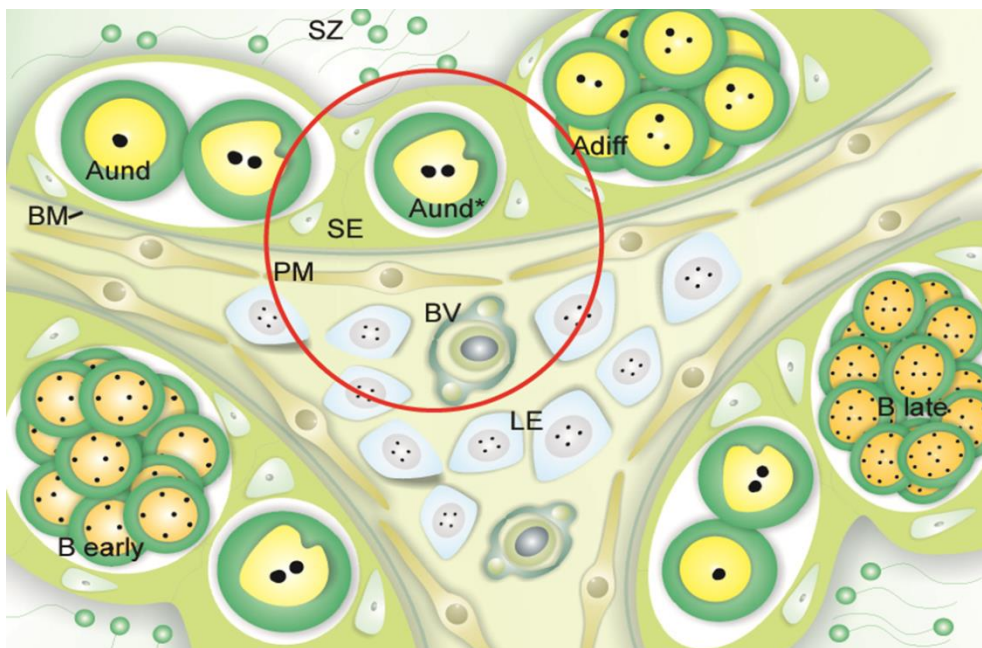
**Figure 13 : Niche germinale chez la souris.** Les cellules de Sertoli soutiennent différents types cellulaires de la spermatogenèse. Les spermatogonies indifférenciées qui constituent le pool de SSC sont en contact direct avec la lame basale ce qui leur permet de recevoir des signaux moléculaires des autres cellules environnantes comme les cellules péritubulaires, les cellules de Leydig ou les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Au niveau apical, la niche germinale est délimitée par les jonctions entre les cellules de Sertoli qui forme une barrière étanche. (adapté de Oatley et Brinster, 2012)

Chez les vertébrés, la niche germinale est principalement formée par les cellules de Sertoli qui sont directement en contact avec les cellules germinales souches à l'intérieur du tube séminifère. Les cellules de Sertoli exercent non seulement un rôle de support ou d'ancrage mais aussi un rôle de régulateur paracrine par l'action de protéines membranaires et par l'action de facteurs sécrétés dans l'espace intercellulaire au sein de la niche. Les niches germinales sont retrouvées tout le long des tubes séminifères chez les mammifères et certains poissons, alors qu'elles peuvent être restreintes à l'extrémité des tubes séminifères chez certaines espèces de poissons osseux ou régionalisées dans une zone dite germinative des testicules comme chez les poissons cartilagineux (Bosseboeuf et al., 2014; Loppion et al., 2008). Les mécanismes impliqués dans la distribution et le nombre de niches restent inconnus même si la proximité des vaisseaux sanguins semble être nécessaire (Nóbrega et al., 2010a; Yoshida et al., 2007) comme illustrée sur les figures 13 et 14. Il est à noter que les cellules endothéliales favorisent la survie et la prolifération *in vitro* des SSC de lapin (Kubota et al., 2011). Il y aurait donc un lien possible entre l'angiogenèse et la distribution des niches. Cependant, cette hypothèse reste peu étayée puisque des recherches menées par le groupe du Dr. Chan en 2014 sur des SSC montrent que ces cellules ne seraient pas associées à la vascularisation (Chan et al., 2014).

L'élément primordial à la formation de cette niche des cellules souches spermatogoniales passe par le lien très fort qui existe entre les cellules de Sertoli et les cellules souches spermatogoniales. Ces deux entités cellulaires intimement associées seront décrites ci-dessous mais il est clair que d'autres cellules testiculaires somatiques comme les cellules de Leydig, péricubulaires (Oatley et al., 2009), endothéliales ou encore les macrophages (DeFalco et al., 2015; Hume et al., 1984) contribuent aux régulations paracrines contrôlant le renouvellement du stock de cellules germinales souches (figures 13 et 14).

#### **4.1. Caractérisation et définition des SSC**

Afin de nous permettre une meilleure compréhension de la biologie des cellules souches spermatogoniales (SSC) au cours de la spermatogenèse, il a été primordial de réussir à les distinguer des autres types de spermatogonies différenciées. Pour cela plusieurs d'études ont été réalisées afin de caractériser les



**Figure 14 : Niche germinale chez le poisson-zèbre.** Cette niche regroupe différents types cellulaires pouvant sécréter des facteurs régulant le caractère souche des SSC. On retrouve les cellules de Sertoli (SE) qui forment des cystes autour des spermatogonies A indifférenciées\* (Aund\*), des spermatogonies A indifférenciées (Aund), des spermatogonies différenciées (Adiff), des spermatogonies B précoces et tardives (B early et B late). On notera aussi la proximité du tissu interstitiel avec les cellules péritubulaires myoïdes (PM), les vaisseaux sanguins (BV) et les cellules de Leydig (LE). (Schéma de Nobrega et al 2010)

SSC à différents niveaux. Dans un premier temps, les recherches ont surtout été basées sur une caractérisation des cellules via leurs morphologies et leurs activités mitotiques (Clermont and Bustos-Obregon, 1968; Huckins and Oakberg, 1978; de Rooij and Russell, 2000). Ensuite, ces cellules ont pu être caractérisées sur un plan plus fonctionnel, de par la mise au point des méthodes de purification basées sur la densité des cellules et de transplantation permettant de mettre en évidence les populations de spermatogonies ayant la capacité de coloniser les gonades, de s'auto-renouveler et de se différencier lorsqu'elles étaient transplantées chez des individus receveurs. Ces techniques ont d'abord été mises au point chez les mammifères (Nagano and Brinster, 1998) puis chez les poissons (Majhi et al., 2009; Nóbrega et al., 2010a; Okutsu et al., 2006). Malheureusement, la pureté relative des fractions spermatogoniales transplantées ne permet pas de distinguer avec certitude les cellules ayant un caractère souche. Cependant, l'amélioration des techniques de purification a permis de mettre en évidence un certain nombre de marqueurs préférentiellement exprimés par les SSC. Ces marqueurs sont de grande utilité car ils permettent d'identifier les SSC in situ, ou encore de les isoler via l'utilisation d'anticorps et d'un cytomètre en flux couplé à un trieur de cellules (FACS).

#### **4.1.1. Invertébrés**

Chez les invertébrés il n'y a pas réellement de marqueurs mis en avant pour cibler les SSC. Ces cellules sont bien identifiables par leur localisation au sein des testicules. En effet les SSC sont les cellules qui sont continuellement en contact avec les cellules du HUB. Lors de la division asymétrique de la SSC, une cellule fille, distante du HUB, sera produite. C'est cette cellule fille qui rentrera en différenciation, la SSC restera toujours associée au HUB (Yamashita et al., 2003).

#### **4.1.2. Mammifères**

##### **4.1.2.1. Les marqueurs de SSC**

Chez la souris, l'identification de marqueurs spécifiques des SSC a connu une réelle avancée avec les travaux de Shinohara en 1999 (Shinohara et al., 1999). Il a



été mis en évidence que de nombreuses cellules souches, dont les SSC, adhéraient à la membrane basale. Sinohara et son équipe se sont donc intéressés aux protéines membranaires impliquées dans l'adhésion des cellules (Ohta et al., 2000) et ils ont mis en évidence les intégrines  $\beta 1$  et  $\alpha 6$ . L'utilisation d'anticorps ciblant ces intégrines a permis de récupérer une population de spermatogonies contenant des SSC comme le montrent les expériences de transplantation (Shinohara et al., 1999). Ils ont alors pu réaliser une première analyse précise de cette population cellulaire enrichie en SSC. Ce serait des cellules montrant une faible dispersion latérale au trieur de cellules, qui expriment fortement l' $\alpha 6$ -intégrine, faiblement l' $\alpha 5$ -intégrine (CD51) et pas du tout c-KIT (Shinohara et al., 2000). C'est en utilisant cette même technique de sélection de cellules que des travaux réalisés par Kubota ont identifié un nouveau marqueur de SSC, THY-1 (Kubota et al., 2003). Après ces premières découvertes un très grand nombre de marqueurs ont été mis en évidence. On peut classer ces marqueurs en deux catégories principales. Les marqueurs membranaires, dont certains peuvent être utilisés pour réaliser des tris via un cytomètre en flux couplé à un trieur de cellules, et les marqueurs intracellulaires qui peuvent être utilisés pour des caractérisations *in situ*. La liste des marqueurs de SSC les plus connus (tableau 1) montre qu'ils ont été identifiés d'abord chez les rongeurs pour la grande majorité d'entre eux puis confirmés chez l'homme. De manière intéressante, certains de ces marqueurs semblent conservés chez les félins (Powell et al., 2016; Vansandt et al., 2016), les équidés (Costa et al., 2012), le buffle (Feng et al., 2016) et bien d'autres espèces (pour review Zheng et al., 2014).

De nos jours, la mise en place de nouvelles techniques d'analyse à haut débit permet d'augmenter grandement la liste des marqueurs de SSC potentiellement intéressants. Des travaux ont récemment été réalisés chez le porc en ce sens (Lee et al., 2016).

Un dernier élément qui pourrait permettre l'identification de marqueurs spécifiques des SSC est l'utilisation du phénotype dit de « side population » (SP). Ce phénotype désigne les cellules qui expulsent rapidement le colorant fluorescent vital Hoesch 33342 (Ho). Des analyses réalisées sur différents tissus comme le muscle (Jackson et al., 1999) ou les neurones (Hulspas and Quesenberry, 2000) montrent que les cellules souches adultes partagent cette caractéristique. La présence de cellules germinales ayant ce phénotype a été mise en évidence chez la souris (Lassalle et al., 2004). Les cellules germinales murines isolées par FACS sur la base

Localisation	Nom Du Gène	Présence chez les rongeurs	Présence chez les poissons
Membrane plasmique	<i>A6-integrin (Cd49f)</i>	(Shinohara et al.,1999)	
Membrane plasmique	<i>B1-integrin (Cd29)</i>	(Shinohara et al.,1999)	
Membrane plasmique	<i>Gfra1</i>	(Meng et al.,2000)	(Lacerda et al., 2013) (Bellaiche et al., 2014b) (Bosseboeuf et al 2014)
Membrane plasmique	<i>Thy-1 (Cd90)</i>	(Kubota et al.,2003)	
Membrane plasmique	<i>Epcam</i>	(Ryu et al., 2004)	
Membrane plasmique	<i>Cd9</i>	(Kanatsu-Shinohara et al.,2004b)	
Membrane plasmique	<i>Ret</i>	(Naughton et al.,2006)	
Membrane plasmique	<i>Cdh1</i>	(Tokuda et al.,2007)	
Membrane plasmique	<i>Gpr125</i>	(Seandel et al.,2007)	
Membrane plasmique	<i>Csf1r</i>	(Oatley et al.,2009)	
Membrane plasmique	<i>ErbB3</i>	(Abid et al., 2014)	
Membrane plasmique	<i>Snap91</i>	(Abid et al., 2014)	
noyau	<i>Stra8</i>	(Giulii et al.,2002)	
noyau	<i>Dnd</i>		(Yazawa et al.,2013) (Liu et al., 2009)
noyau	<i>Pou5f1</i>	(Ohbo et al.,2003)	(Lacerda et al., 2013) (Bosseboeuf et al., 2014) (Bellaiche et al., 2014a)
noyau	<i>Nanos2</i>	(Tsuda et al. 2003)	(Bellaiche et al., 2014a)
noyau	<i>Plzf</i>	(Costoya et al.,2004)	(Bellaiche et al., 2014a)
noyau	<i>Tspy</i>	(Kido and Lau,2006)	
noyau	<i>Utf1</i>	(van Bragt et al., 2008)	
noyau	<i>Id4</i>	(Oatley et al.,2009)	
unknow	<i>Bcrp1</i>	(Lassalle et al., 2004)	
noyau	<i>Etv5a</i>	(Schlesser et al.,2008)	
noyau	<i>Brachyury</i>	(WuX et al.,2011)	

**Tableau 1: récapitulatif des différents marqueurs des SSC trouvés chez les rongeurs et les poissons**

du critère SP ont la capacité de coloniser et d'induire des vagues spermatogénétiques après transplantation. Cette information est toutefois à prendre avec précaution puisque d'autres équipes de recherche n'ont pas réussi à trier les SSC sur la base de ce seul critère SP (Kubota et al., 2003; Shinohara et al., 2011).

#### **4.1.2.2. Dynamique de renouvellement du stock de SSC**

L'observation morphologique des cellules, l'étude de leur cycle mitotique, et l'observation par radiographie ont permis à Clermont et Busto Obregon, en 1968 de mettre en avant une première hypothèse concernant la nature des entités cellulaires de type SSC et leur dynamique de renouvellement. Il existerait selon eux deux populations de cellules souches spermatogoniales. Les spermatogonies A0, qui sont des cellules isolées quiescentes et une population de spermatogonies initialement nommées de A1 à A4 qui elles, auraient la possibilité de s'auto-renouveler ou de poursuivre le processus de différenciation. Cette idée de double population de SSC est reprise par Yoshida qui définit une population de cellules souches potentielles (quiescentes) et une population de cellules souches actuelles (Nakagawa et al., 2007). En parallèle, un deuxième modèle de dynamique de renouvellement des SSC est proposé par Huckins et Oakberg (Huckins and Oakberg, 1978) qui définissent la cellule souche spermatogonale comme une spermatogonie A isolée (A seule) qui soit, subit une mitose pour s'auto-renouveler, soit se divise de manière incomplète pour produire des spermatogonies A en paire (Apr) reliées par un pont intercytoplasmique.

Les modèles de la dynamique de renouvellement du stock de SSC ont beaucoup évolué depuis ces études pionnières grâce à l'apparition des différents marqueurs de cellules souches (Cf chapitre précédent). Ainsi les travaux récents de l'équipe de Yoshida ont pu proposer un nouveau modèle, moins vertical, précisant la dynamique de renouvellement des SSC. En effet, en observant *in vivo*, les populations de spermatogonies GFR $\alpha$ 1 (GDNF Family Receptor Alpha 1) positives, qui sont considérées comme à la base du processus spermatogénétique (Nakagawa et al., 2010; Sada et al., 2009), ils ont pu mettre en évidence que le renouvellement des SSC faisait aussi intervenir les spermatogonies A en paires (Ap) et les spermatogonies A alignées (Aal) (Hara et al., 2014). Il n'y aurait donc pas une cellule souche unique (As) qui supporte seule la spermatogenèse tout le long de la vie de

l'individu, mais un ensemble de cellules composé des As, Apr et Aal partageant les mêmes propriétés souches. Malgré tout, de nombreuses études considèrent encore les cellules As comme les « vraies » SSC alors que les spermatogonies Apr et Aal demeurent des progéniteurs (figure 15).

### **4.1.3. Poissons**

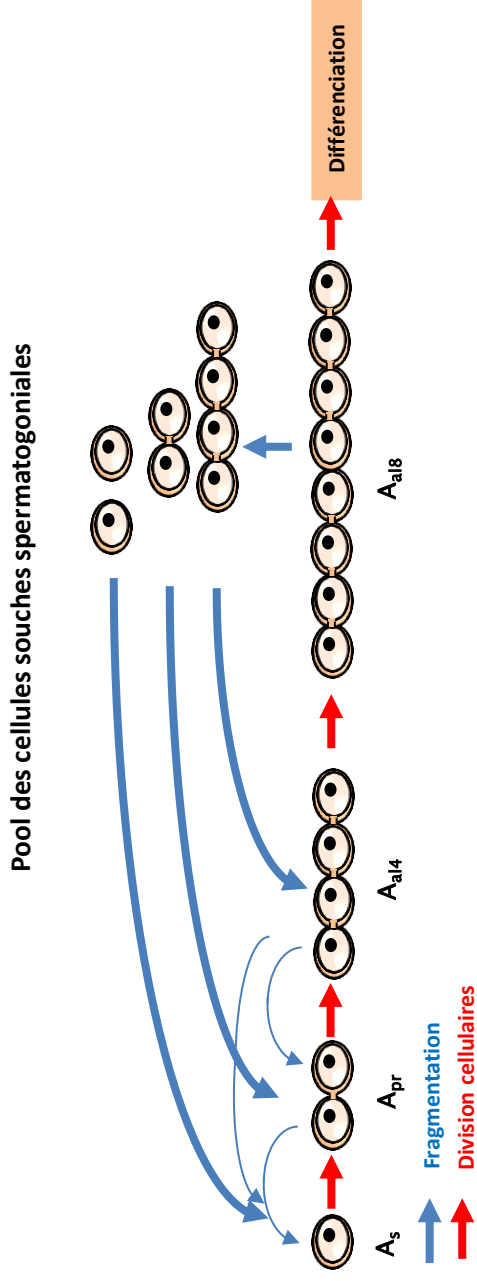
#### **4.1.3.1. Les marqueurs de SSC**

Chez les poissons, la caractérisation des SSC a d'abord été initiée essentiellement sur la base de critères morphologiques observés *in situ* (Koulish et al., 2002; Miura et al., 2003; Nóbrega et al., 2010a; Papah et al., 2013). Dans le but d'approfondir la caractérisation morphologique, moléculaire et fonctionnelle des SSC, la purification des spermatogonies indifférenciées a été menée à l'aide de techniques d'élutration centrifuge ou de gradients de sédimentation (Loir, 1994; Santos Nassif Lacerda et al., 2013a; Wong et al., 2013; Yoshikawa et al., 2009). Des techniques basées sur la cytométrie en flux ont été plus récemment utilisées (Kise et al., 2012). A ce jour et à cause du manque de marqueurs membranaires spécifiques disponibles, le moyen le plus fiable pour vérifier le caractère souche des SSC purifiées demeure la transplantation (Bellaiche et al., 2014; Lacerda et al., 2010; Nagano and Yeh, 2013; Okutsu et al., 2006; Santos Nassif Lacerda et al., 2013a; Yano et al., 2008).

Ces cinq dernières années ont été marquées par un certain nombre d'études qui mettent en avant la conservation de nombreux marqueurs précédemment identifiés chez les mammifères incluant *pou5f1*, *gfra1*, *nanos2* et *plzf* (tableau 1). Il est aussi intéressant de noter que le caractère Side Population présenté précédemment, pourrait permettre la préparation de populations spermatogoniales enrichies en SSC chez les poissons téléostéens (Hayashi et al., 2014).

#### **4.1.3.2. Dynamique de renouvellement.**

La caractérisation précise des SSC chez les poissons étant encore manquante, il n'y a pas de réelle étude sur la dynamique de renouvellement des SSC. L'idée principale (figure 7) suit le modèle de Huckins et Oakberg, avec une



**Figure 15 : Dynamique de renouvellement du stock de SSC chez la souris.** Les cellules souches spermatogoniales sont constituées d'un pool de spermatogonies indifférenciées, comprenant les A seules ( $A_s$ ), les A en paires ( $A_{pr}$ ), les A alignées ( $A_{al}$ ). Ces cellules peuvent continuellement et de manière réversible se séparer par fragmentation syncytiale, ou se diviser afin de toujours maintenir le pool de cellules souches spermatogoniales, mais aussi d'initier la différenciation.

cellule souche unique isolée comme seule SSC. Cela correspondrait au Aind ou Aind\* chez le poisson-zèbre (Schulz et al., 2010a), A0 et A1 chez la truite (Loir, 1999a), et au A single chez la roussette (Bosseboeuf et al., 2014).

## **4.2. La cellule de Sertoli**

La cellule de Sertoli joue un rôle primordial dans le bon déroulement de la spermatogenèse, quelles que soient les espèces. C'est une cellule qui a été décrite dès 1965 (Sertoli, 1865) et qui depuis a fait l'objet de nombreuses recherches (França et al., 2016).

### **4.2.1. Origine et devenir des cellules de Sertoli**

Chez les mammifères, la formation des cellules de Sertoli se déroule au cours du développement embryonnaire. La crête génitale qui donnera la future gonade se met en place entre 10.5 et 11.5 jours après la fécondation. Cette crête génitale est composée de cellules somatiques provenant de l'épithélium cœlomique. Certaines de ces cellules vont exprimer le gène de différenciation sexuelle *sry*. On les appelle les pré-cellules de Sertoli. Ces cellules, initialement de nature mésenchymateuse, vont s'engager dans une transition pour passer du type mésenchymateux au type épithélial (Albrecht and Eicher, 2001). Ce processus se fait par la polarisation des cellules, engendrée par l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (Skinner and Griswold, 2004). Les cellules de Sertoli proliféreront durant la vie fœtale et jusqu'à la puberté de l'individu grâce à l'action de facteurs comme la FSH (Follicle Stimulating Hormone), l'activine ou encore les oestrogènes. Ensuite au moment de la puberté un pic d'hormones thyroïdiennes va bloquer la prolifération des cellules de Sertoli qui vont alors commencer leur maturation. Ce processus est régi par de nombreux éléments comme les hormones thyroïdiennes, la FSH, l'activine, l'acide rétinoïque etc... . *In fine* on a un pool de cellules de Sertoli qui soutiendra la spermatogenèse tout le long de la vie de l'individu (Pour revue : Lucas et al., 2014).

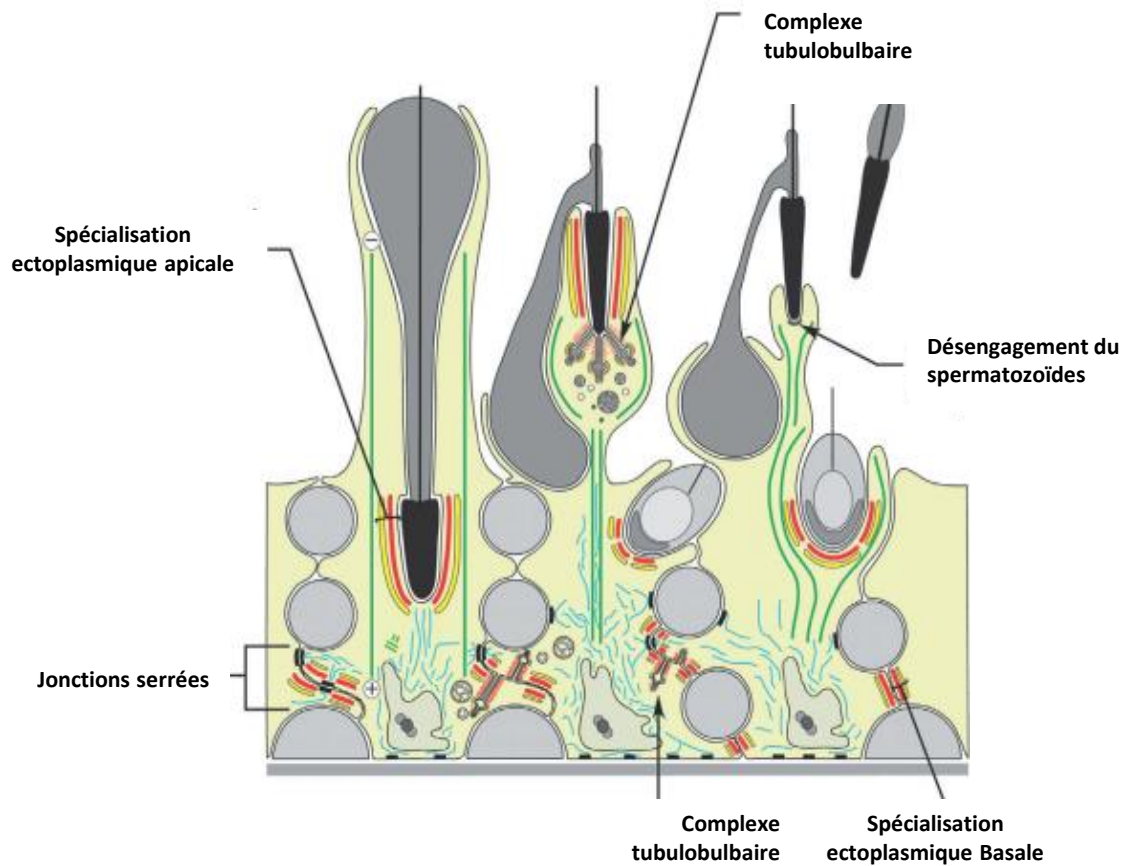
Chez le medaka et le poisson globe il a été proposé que les cellules somatiques provenant du mésoderme latéral, viennent entourer les PGC durant leur migration pour contribuer à la formation de la gonade (Hamaguchi, 1982; Kobayashi et al., 2004). Ces cellules expriment le gène *dmrt1* (Doublesex and mab-3 related

transcription factor 1), qui est impliqué dans la cascade des gènes contrôlant la différenciation sexuelle. Chez l'adulte, le gène *dmrt1* est exprimé spécifiquement dans les cellules somatiques supportant les cellules germinales mâles, les cellules de Sertoli. Ces cellules qui entourent les PGC au cours du développement seraient donc bien les pré-cellules de Sertoli chez le poisson (Kobayashi et al., 2004; Yamaguchi et al., 2006). Il est important de noter ici une différence fondamentale entre les cellules de Sertoli des espèces amniotes et anamniotes. En effet, chez les amniotes le pool de cellules de Sertoli est établi lors de la formation de la gonade et il ne variera pas tout au long de la vie de l'individu. Chez les anamniotes les cellules de Sertoli vont avoir la capacité de proliférer chez l'animal adulte et cela de deux manières. Dans le premier cas de figure, les cellules de Sertoli vont proliférer afin qu'il y ait toujours des cellules de Sertoli disponibles pour créer la niche nécessaire au maintien des SSC, et pour former de nouveaux cystes de cellules en développement (França et al., 2015). Dans le deuxième cas, on va avoir une prolifération liée à l'augmentation du nombre de cellules germinales au sein du cyste. Les cellules de Sertoli qui délimitent un cyste vont devoir se multiplier afin de laisser un espace suffisant aux cellules germinales en développement (Almeida et al., 2008; França et al., 2015).

#### **4.2.2. Morphologie et structure des cellules de Sertoli**

La comparaison des cellules de Sertoli entre les espèces, permet de mettre en évidence certaines similitudes concernant leur origine et leurs fonctions (Grier et al., 2005). Cependant ces observations ne sont pas figées puisque les cellules subissent des modifications morphologiques ou organisationnelles en fonction des différentes étapes de la spermatogenèse (Billard and Escaffre, 1970; Billard et al., 1972; Guraya, 1995a; Ueno and Mori, 1990).

Chez une majorité de vertébrés, la cellule de Sertoli va avoir une forme pyramidale. Elle est composée d'un noyau large avec une chromatique peu condensée (euchromatique) ce qui semble logique au regard de la grande capacité sécrétrice de cette cellule (Guraya, 1995b). Le nucléoplasme qui est homogène contient un nucléole et des structures denses aux électrons composées d'une forte concentration d'hétérochromatine appelées chromocentres. Les cellules de Sertoli,



**Figure 16 : Représentation schématique du cytosquelette de la cellule de Sertoli.** Les cellules de Sertoli sont en vert clair et les cellules germinales en gris. On retrouve des filaments d'actine en rouge et les microtubules en vert foncé, les filaments intermédiaires en bleu, et le réticulum endoplasmique en jaune. (Franca et al 2016)



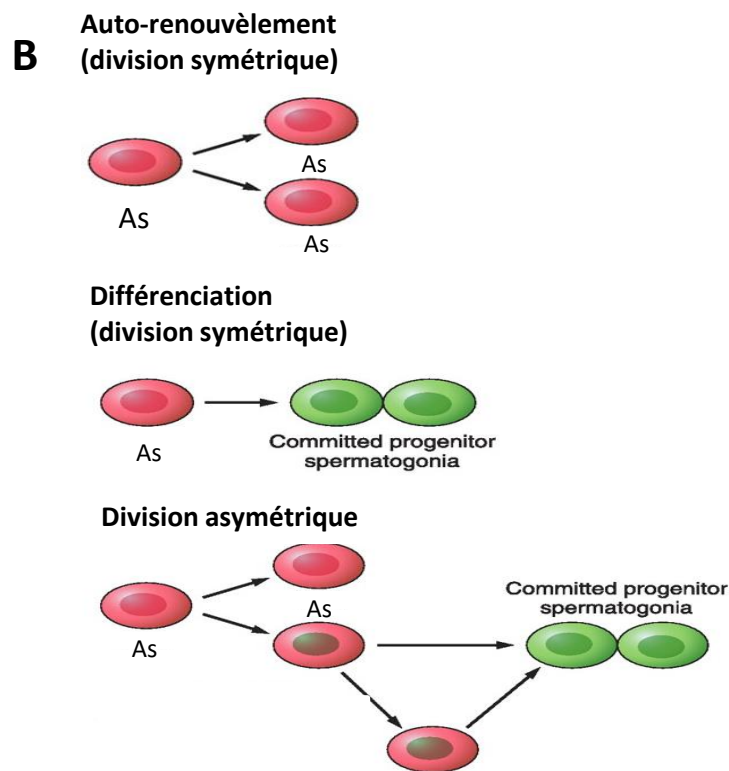
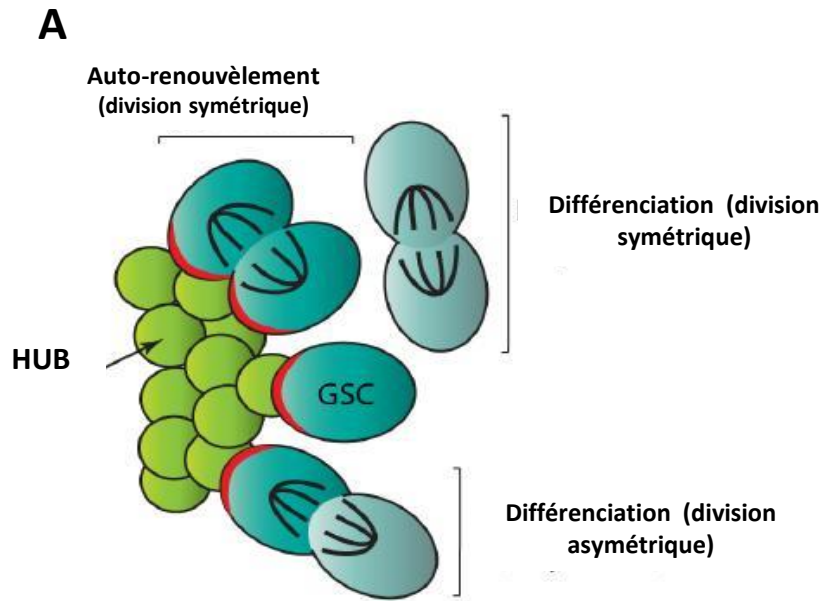
vont aussi contenir un grand nombre d'organelles. On retrouve des mitochondries longues et minces, un large appareil de golgi (qui serait constitué de multiples éléments de golgi disséminés à l'intérieur du cytoplasme), un réticulum endoplasmique abondant, de nombreux lysosomes, vésicules et phagosomes. On peut aussi retrouver des inclusions lipidiques, mais ceci est variable en fonction des espèces (Billard and Escaffre, 1970; Billard et al., 1972; Cassel et al., 2013; Chung, 2008; França et al., 2016; Grier et al., 1978, 2005; Guttenbach et al., 1996; Kushida et al., 1993). Le cytosquelette est un élément primordial de la cellule de Sertoli car il permet de réaliser de nombreux processus. Chez les mammifères, les cellules de Sertoli forment une sorte d'immense colonne soutenant de nombreuses cellules germinales (figure 16). Ceci n'est possible que grâce aux multiples microtubules qui vont parcourir la cellule sur toute sa longueur permettant ainsi le maintien de cette structure (Allard et al., 1993; Russell et al., 1981). Des filaments d'actine vont être impliqués dans les jonctions cellulaires (via les spécialisations ectoplasmiques et les complexes tubulobulbaires) (Mruk and Cheng, 2004; Russell and Clermont, 1976). Les filaments intermédiaires sont principalement retrouvés autour du noyau (figure 16), avec des extensions qui rejoindront les jonctions de type desmosome. Parmi ces filaments on retrouve la vimentine (Type III) (Franke et al., 1979), la kératine (Paranko et al., 1986) et la nestine (Miettinen et al., 1985).

Chez les poissons, il y a moins d'informations sur la composition du cytosquelette de la cellule de Sertoli. Cependant, de par l'organisation cystique de la spermatogenèse, on retrouve une organisation du cytosquelette différente de celle observée chez les mammifères. En effet, chez les poissons, les cellules de Sertoli qui délimitent les cystes vont avoir besoin d'une grande plasticité afin de s'adapter à l'augmentation du nombre de cellules germinales contenu dans chaque cyste. On ne retrouve que très peu ou pas de microtubule, mais on note la présence de filaments d'actine et de filaments intermédiaires (tonofilaments de kératine) qui sont impliqués dans la formation de desmosomes et de jonctions serrées. (Billard and Escaffre, 1970; Billard et al., 1972; Cassel et al., 2013; Leal et al., 2009a; Magalhães et al., 2011; Schulz et al., 2010a).

#### **4.2.3. Rôle des cellules de Sertoli dans la niche.**

Comme précisé précédemment, l'interaction particulière qui existe entre la cellule de Sertoli et les cellules germinales, au sein de la niche, en font un élément essentiel de sa mise en place. En effet, elle est à l'origine de la sécrétion de nombreux facteurs paracrines qui sont impliqués dans les voies de signalisation permettant l'homéostasie des SSC. Chez les mammifères, elle permet la production de GDNF (Glial Cell Derived Neurotrophic Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), CXCL12 et CCL9 (C-C Motif Chemokine Ligand) qui activent l'autorenouveaulement (Chen and Liu, 2015), et LIF (Leukemia Inhibitory Factor) qui aide au maintien de l'état souche des SSC. La cellule de Sertoli exprime aussi le récepteur Notch qui, lorsqu'il est activé par le ligand DDL des cellules germinales régulerait négativement la production de GDNF conduisant à un ralentissement de l'autorenouveaulement cellulaire (França et al., 2016). De plus, il a été mis en évidence que lors d'une transplantation de SSC, le nombre de cellules de Sertoli présentes régirait le nombre de niches colonisées (Oatley et al., 2011a). Chez les Poissons, on retrouve ce même rôle central de la cellule de Sertoli qui va être à l'origine de l'expression de nombreux facteurs paracrines permettant le maintien des SSC (voir chapitre suivant).

Chez les mammifères, en plus de son rôle de cellule sécrétrice au sein de la niche, elle va aussi être la cellule à l'origine de la délimitation de la niche germinale via la formation de la barrière hémato-testiculaire. Chez les mammifères, la barrière hémato-testiculaire implique 3 catégories de jonctions, les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les spécialisations ectoplasmiques. Les jonctions serrées (appelées aussi zonula occludens) sont des complexes formés de protéines transmembranaires comme l'occludine, les claudines et des molécules d'adhésion de jonction (JAM). Elles ont un rôle très important car elles confèrent une certaine imperméabilité à l'épithélium (Chihara et al., 2010; Mruk and Cheng, 2010). Les jonctions adhérentes comprennent les desmosomes et les jonctions de types GAP. Cette barrière va permettre de délimiter deux zones à l'intérieur du tube séminifère. On retrouve le compartiment basal qui renferme les spermatogonies et un compartiment adluminal qui va comporter les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes. Du fait de leur position au niveau basal, bien avant cette barrière hémato-testiculaire (figure 13), les SSC sont en contact permanent avec les facteurs sécrétés par le tissu interstitiel ou venant de la circulation vasculaire (Oatley and Brinster, 2012).



**Figure 17 : modèle de division des cellules germinales souches chez la drosophile (A) et la souris (B).** Chez la drosophile, en fonction du lien que vont avoir les cellules avec le HUB on retrouve trois cas de figure possibles. La division symétrique impliquée dans l'autorenouveaulement du stock de SSC (les deux cellules sont en contact avec le HUB). La division symétrique de différenciation (les deux cellules ont perdu le contact avec le HUB) et la division asymétrique de différenciation (la cellule mère reste en contact avec le HUB, mais pas la cellule fille). Chez les mammifères on retrouve ces 3 mêmes schémas de division. (Adaptée de E. La Marca et al., 2014 et Oatley et Brinster, 2012.)

Chez les poissons, la barrière hémato-testiculaire est bien retrouvée chez de nombreuses espèces, comme le poisson-zèbre (Leal et al., 2009a), le guppy (Billard and Escaffre, 1970), la grande perche (Grier and Linton, 1977), ou encore le poisson crayon (Magalhães et al., 2011). Elle ne se forme qu'après la fin de la méiose au moment où le cyste va cesser de grandir (França et al., 2015; Leal et al., 2009a).

Si la cellule de Sertoli a un rôle extrêmement important dans la constitution des gradients de molécules, ainsi que pour l'ancrage des SSCs au sein de la niche, elle assure aussi le soutien des cellules méiotiques et post-méiotiques (transport de nutriments à travers la barrière) (Onoda and Djakiew, 1990, 1991), et une certaine protection immunitaire (Doyle et al., 2012) chez les mammifères. La cellule de Sertoli joue aussi un rôle dans la gestion des cellules apoptotiques et des débris cellulaires. En effet, des résidus de cytoplasme appelés corps résiduels sont relargués pendant la formation des spermatides chez les mammifères (Shukla et al., 2012; Xiong et al., 2009). Ces corps résiduels sont éliminés par phagocytose grâce à la cellule de Sertoli (Carr et al., 1968)

## **5. Mécanismes cellulaires impliqués dans le renouvellement du stock de SSC**

### **5.1. Maintien du stock de SSC par division asymétrique**

Ce mode de division a été particulièrement bien étudié dans le contexte du renouvellement des SSC chez la drosophile. Chez cette espèce, les SSC sont en contact avec une structure particulière appelée le HUB. Les SSC se divisent de manière asymétrique, pour produire deux cellules filles mais une seule de ces cellules filles reste ancrée au HUB. Cette cellule gardera toutes les propriétés morphologiques et fonctionnelles de la SSC. Par contre, la seconde cellule fille générée, qui perd contact avec le HUB, va s'engager dans un processus de différenciation (figure 17). Ce patron de division est défini par l'orientation précise des axes de symétrie du fuseau de division lors de la mitose. Les axes sont alignés perpendiculairement à l'interface entre le HUB et la SSC (Yamashita and Fuller, 2008) ce qui entraîne l'éloignement de la cellule fille du HUB. Plusieurs composants cellulaires, sont alors asymétriquement ségrégués, comme le centrosome, certains

histones et dans certains cas les chromosomes sexuels, alors que les autres chromosomes ségrégent de manière aléatoire (Tran et al., 2012; Yadlapalli and Yamashita, 2013).

### **5.2. Maintien et amplification du stock de SSC par division symétrique**

Chez les insectes, il existe aussi de manière plus rare, l'apparition de divisions dites symétriques (figure 17). Si les deux cellules filles restent attachées au HUB, elles reconstitueront le stock de cellules souches. Si les deux cellules perdent contact avec le HUB, elles s'engageront toutes les deux dans un processus de différenciation (Salzmann et al., 2013; Sheng and Matunis, 2011).

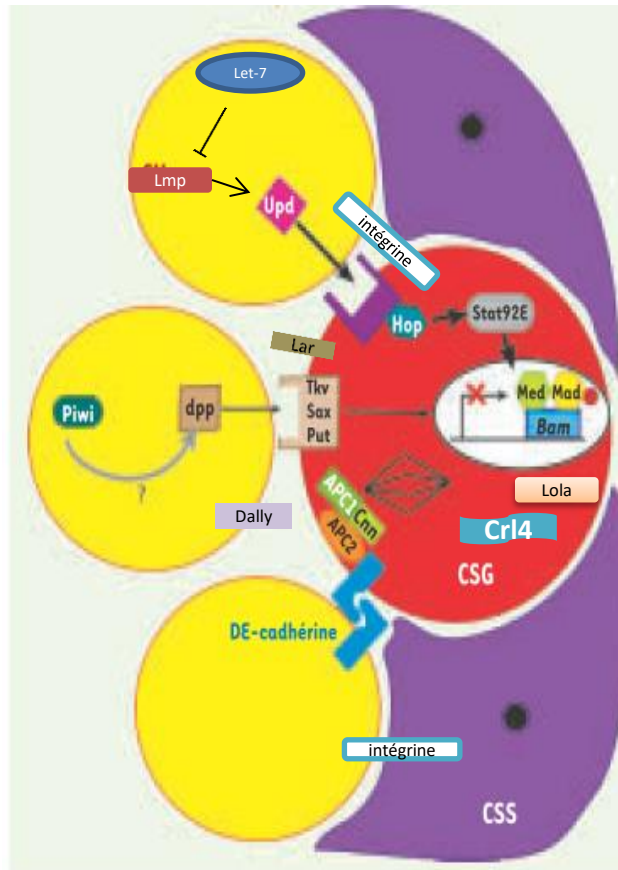
Chez les vertébrés, le modèle de division symétrique est privilégié. Les SSC qui se divisent peuvent terminer leur division par une cytokinèse complète qui conduira à la formation de deux cellules souches germinales identiques (auto-renouvellement). Cependant, la cytokinèse peut aussi être incomplète ce qui conduira à la formation de deux cellules filles reliées par un pont intercellulaire. Les deux cellules interconnectées généralement appelées cellules spermatogoniales en paires ou alignées en chaînes de 4 à 16 cellules vont s'engager dans le processus de différenciation (de Rooij and Russell, 2000) mais ces progéniteurs peuvent aussi être reconvertis en cellules souches germinales après rupture des ponts cytoplasmiques (voir paragraphe suivant). Bien que le modèle de la division symétrique soit présenté comme le modèle dominant chez les mammifères (figure 17), certains auteurs n'excluent pas des événements de divisions asymétriques qui permettraient de générer une SSC et un progéniteur destiné à amplifier le stock des spermatogonies engagées dans la différenciation (Nakagawa et al., 2007; de Rooij and Russell, 2000).

### **5.3. Fragmentation clonale et interconversion de progéniteurs.**

Des analyses réalisées *in vivo* chez la drosophile ont permis de mettre en évidence un troisième mécanisme de division impliqué dans le renouvellement des SSC (figure 17). Grâce à l'utilisation de la souche de drosophile *stat92E<sup>F</sup>/stat92E<sup>06346</sup>* exposée à une température de 29°C, une perte massive des cellules souches germinales peut être induite pour étudier les mécanismes impliqués dans la ré-

initiation de la spermatogenèse (Baksa et al., 2002). Ce modèle d'étude a permis de mettre en évidence que des cellules spermatogoniales déjà différenciées et regroupées en cystes de plusieurs cellules, peuvent, après la rupture de leur liaison assurée par un pont intercytoplasmique, reformer des cellules souches germinales indifférenciées (Brawley and Matunis, 2004). Le fait que des progéniteurs puissent être reconvertis en cellules souches germinales (figure 17) a également été confirmé par des observations basées sur l'imagerie en temps réel chez la souris. Il a été observé que les chaînes de 8 spermatogonies alignées, exprimant la NGN (Neurogenin), peuvent se fragmenter pour donner une chaîne de 6 cellules et une chaîne de 2 cellules (Hara et al., 2014; Nakagawa et al., 2010). De plus, chez la souris, la transplantation de progéniteurs germinaux (exprimant le marqueur c-KIT) dans des testicules de souris adultes et dépourvus de cellules germinales suite à un traitement par irradiation, a permis de montrer que les cellules c-KIT<sup>+</sup> transplantées étaient capables d'initier une nouvelle vague de spermatogenèse complète, ainsi qu'un pool de cellules souches qui expriment de nouveau le marqueur THY-1 mais plus le marqueur c-KIT (Barroca et al., 2009; Kubota et al., 2004; Shinohara et al., 2000).

En résumé, chez la majorité des invertébrés, comme le nématode ou les insectes, le renouvellement du stock des SSC au cours de la spermatogenèse passe principalement par des divisions dites asymétriques de la SSC mais cet équilibre est modifié en faveur d'interconversions de progéniteurs ou de divisions symétriques lors d'une régénération faisant suite à une perte massive induite artificiellement par un traitement chimique ou par irradiation (Kimble and White, 1981; Spradling et al., 2001). Chez les mammifères c'est le modèle de la division dite symétrique des SSC qui est pour l'heure privilégié (Oakberg, 1971; de Rooij and Russell, 2000) mais un processus d'interconversion de progéniteurs pourrait également participer au renouvellement du stock de SSC (Hara et al., 2014). Chez les poissons, les observations acquises à ce jour restent très parcellaires et basées sur des observations morphologiques. La présence de cellules souches germinales en doublets a été observée chez de nombreuses espèces au cours du développement des alevins et/ou chez l'animal pubère. Les modèles de la spermatogenèse proposés à ce jour pour les poissons privilégient l'hypothèse que ces doublets constituent le premier stade de formation de cystes qui renferment des spermatogonies en cours



**Figure 18 : Renouveau des SSC au sein de la niche testiculaire chez la drosophile.** Chez la drosophile, la liaison avec le HUB est un élément primordial dans la régulation du devenir des cellules souches germinales (CSG). De nombreux facteurs comme les voies de signalisation Dpp/Gbb, Upd/JAK.STAT, les protéines d'adhésion DE-Cadhérine, intégrine, et des récepteurs comme Lar et Dally sont impliqués dans le processus d'auto-renouveau des SSC. Au niveau intracellulaire, on retrouve des facteurs de transcription comme Lola, ou le complexe d'ubiquitination Crl4, qui sont eux aussi nécessaires au processus d'autorenouveau des CSG. (Adapté de Jagut and Huynh, 2007)

de différenciation de manière synchrone (Leal et al., 2009a; Schulz et al., 2010a). L'hypothèse d'un processus de fragmentation clonale de ces doublets et d'interconversion de ces progéniteurs n'est toutefois pas écartée même si aucune étude expérimentale ne vient confirmer cette hypothèse à ce jour (Bosseboeuf, 2013; Lacerda et al., 2014).

## **6. Mécanismes moléculaires impliqués dans le renouvellement du stock de SSC.**

De nombreuses études ont permis de mieux comprendre comment les cellules somatiques régulent les propriétés de survie et de prolifération des SSC. Ces études ont aussi permis d'identifier des voies de régulations intracellulaires exprimées au sein de la SSC et qui relaient l'action des facteurs paracrines.

### **6.1. Régulations paracrines et intracellulaires**

#### **6.1.1. Drosophile**

##### **6.1.1.1. Facteurs paracrines**

Le maintien et l'autorenouveau des cellules germinales souches chez les invertébrés comme la drosophile fait intervenir un large éventail de signaux provenant du HUB (figure 18).

#### **Voie Gbb/DPP**

Gbb (Glass Bottom Boat) et Dpp (Decapentaplegic), sont des ligands des BMP. Ils vont se fixer aux récepteurs hétérométriques (Put/Tkv ou Wit/Sax) (Parker et al., 2004), et entraîner la phosphorylation de Mad. Ce facteur Mad phosphorylé va pouvoir former un complexe avec Mep qui est alors dirigé dans le noyau pour réguler l'expression de nombreux gènes (figure 18). Dans le cas de la cellule souche germinale, l'action de MEP entraîne une inhibition de l'expression d'un facteur de différenciation Bam (Chen and McKearin, 2003; Kawase et al., 2004). Les protéoglycane héparine sulfates, comme Dally (Division Abnormally Delayed),



semblent aussi impliqués dans l'autorenouveau via son rôle de corécepteur dans la signalisation induite par Dpp (Hayashi et al., 2009).

### **Voie Upd/JAK-STAT**

La cytokine Upd (unpaired) est sécrétée par les cellules du HUB. Elle interagit, au niveau de la membrane des cellules germinales, avec un récepteur de la voie JAK/STAT (Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription) appelé Domeless (Brown et al., 2001). Ceci entraîne l'activation de la kinase JAK Hopscotch (Hop) qui phosphoryle à son tour Stat92E. La protéine Stat92E phosphorylée va ensuite pouvoir entrer dans le noyau (Zeidler et al., 2000) et activer des gènes impliqués dans l'auto-renouveau des cellules germinales et des cellules formant le cyste (cyst cell) (Kiger et al., 2001; Tulina and Matunis, 2001).

La voie JACK/STAT permet aussi le maintien de l'expression de l'E-Cadhérine qui, avec la  $\beta$ -caténine et l'Apc2 (Adenomatosis Polyposis Coli 2), forment les jonctions adhérentes entre les cellules du HUB et les cellules germinales souches (figure 18). Cette E-cadhérine est régulée via l'action d'Abp (Actin Binding Protein) comme la Prolifine (Shields et al., 2014) et elle est importante pour le maintien du pool de SSC (Boyle et al., 2007; Leatherman and Dinardo, 2010). On sait par exemple que les SSC appauvries en STAT, montrent une perturbation de leur adhésion aux cellules du HUB ce qui entraîne une différenciation de ces cellules. L'augmentation du niveau d'E-cadhérine permet de réduire cette perte de cellules germinales souches. Cette voie de signalisation semble en partie régulée via l'action de protéines Imp (IGF-II mRNA-binding proteins). En effet les Imp se lient à l'ARNm d'*Upd* et le protège de la dégradation. Avec l'âge, il a été mis en évidence une augmentation de Let-7 (un miRNA hétérochronique) qui va inhiber l'action des Imp (figure18), entraînant alors une baisse de l'expression d'*Upd* (Toledano et al., 2012).

### **Voie des récepteurs à la tyrosine Kinase**

Le récepteur à tyrosine phosphatase Lar (leukocyte common antigen-related) serait impliqué dans la mise en place de jonctions solides entre les cellules germinales et les cellules du HUB. Il participerait à la bonne expression et répartition de l'E-cadhérine au niveau du HUB (figure 18), mais sans pour autant intervenir dans la voie de signalisation JAK/STAT. (Srinivasan et al., 2012).

### **Régulation via l'intégrine.**

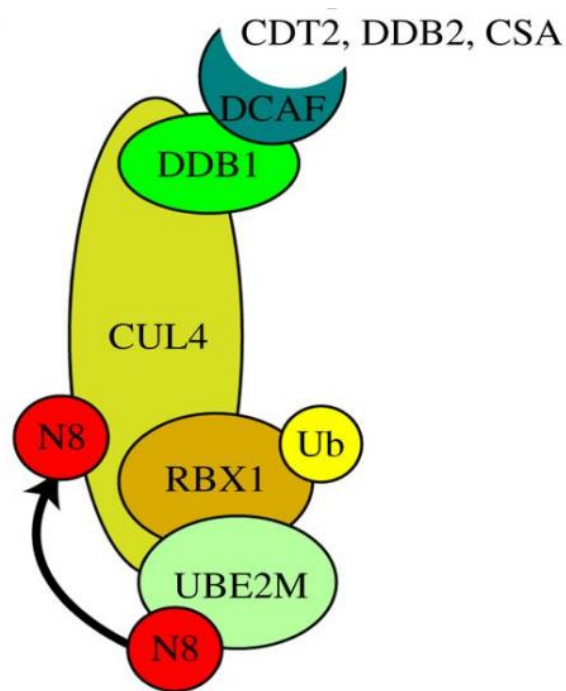
Un paramètre important pour le renouvellement des cellules germinales souches chez la drosophile, concerne l'encombrement spatial. En effet, nous avons bien vu que la liaison aux cellules du HUB est un élément clef de la mise en place de la niche, et donc du devenir des cellules souches germinales chez la drosophile. Cette idée est de nouveau confortée par l'implication de l'intégrine. En effet, deux types cellulaires ont besoin d'être en contact avec le HUB. Les cellules souche germinales, et les cellules souches du cyste. Les adhésions cellulaires via l'intégrine jouent un rôle dans le maintien du bon ratio entre cellules germinales et les cellules du cystes, ce qui est un élément crucial pour créer un environnement propice au bon renouvellement des cellules germinales souches (Issigonis et al., 2009; Tanentzapf et al., 2007).

#### **6.1.1.2. Facteurs intracellulaires**

Lola (Longitudinals Lacking) est un régulateur de la transcription qui est impliqué dans la maintenance des cellules souches germinales (Davies et al., 2013). On notera aussi le rôle des facteurs de remodelage des nucléosomes (Nurf) qui vont permettre une expression de Stat et une répression du facteur de différenciation (Bam) (Cherry and Matunis, 2010; Matunis et al., 2012)

Le gène *Zpg* (zero population growth) code pour une protéine, l'Annexin4, impliquée dans les jonctions entre cellules au niveau de la lignée germinale. Des mutations de ce gène entraînent une baisse de la prolifération des spermatogonies et éventuellement leur mort. (Tazuke et al., 2002)(Papagiannouli and Mechler, 2009).

Des recherches récentes, ont mis en évidence le rôle du complexe Crl4 (Cullin 4 ring Ubiquitin Ligase) dans l'auto-renouvellement des GSC ainsi que de nombreux autres gènes. Ce complexe est formé de plusieurs éléments (figure 19). On retrouve Dcaf (Ddb1 and Cul4 associated factors) qui a le rôle de récepteur de substrat. Ddb1 est une protéine qui fait le lien entre Dcaf et la protéine Cul4 (Cullin4). On retrouve enfin la partie active du complexe, qui va avoir pour rôle d'ubiquitiner les cibles. Elle est formée par Nedd8 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8), Rbx1 (Ring-Box 1) et Ube2m (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 M) (figure 19). Des KO réalisés contre Cul4, Nedd8 et Dcaf ont montré une perturbation de l'autorenouvellement et de la maintenance des cellules souches germinales. Ces



**Figure 19 : Complexe d'ubiquitination Crl4 :** Ce complexe est formé de plusieurs éléments, on retrouve un récepteur Dcaf qui est relié à la protéine Cul4 via la protéine linker Ddb1. Cette première partie va être complétée par le site actif du complexe composé de Nedd8 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8), Rbx1 (Ring-Box 1) et Ube2m (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 M). Adapté de (Brown and Jackson, 2015)

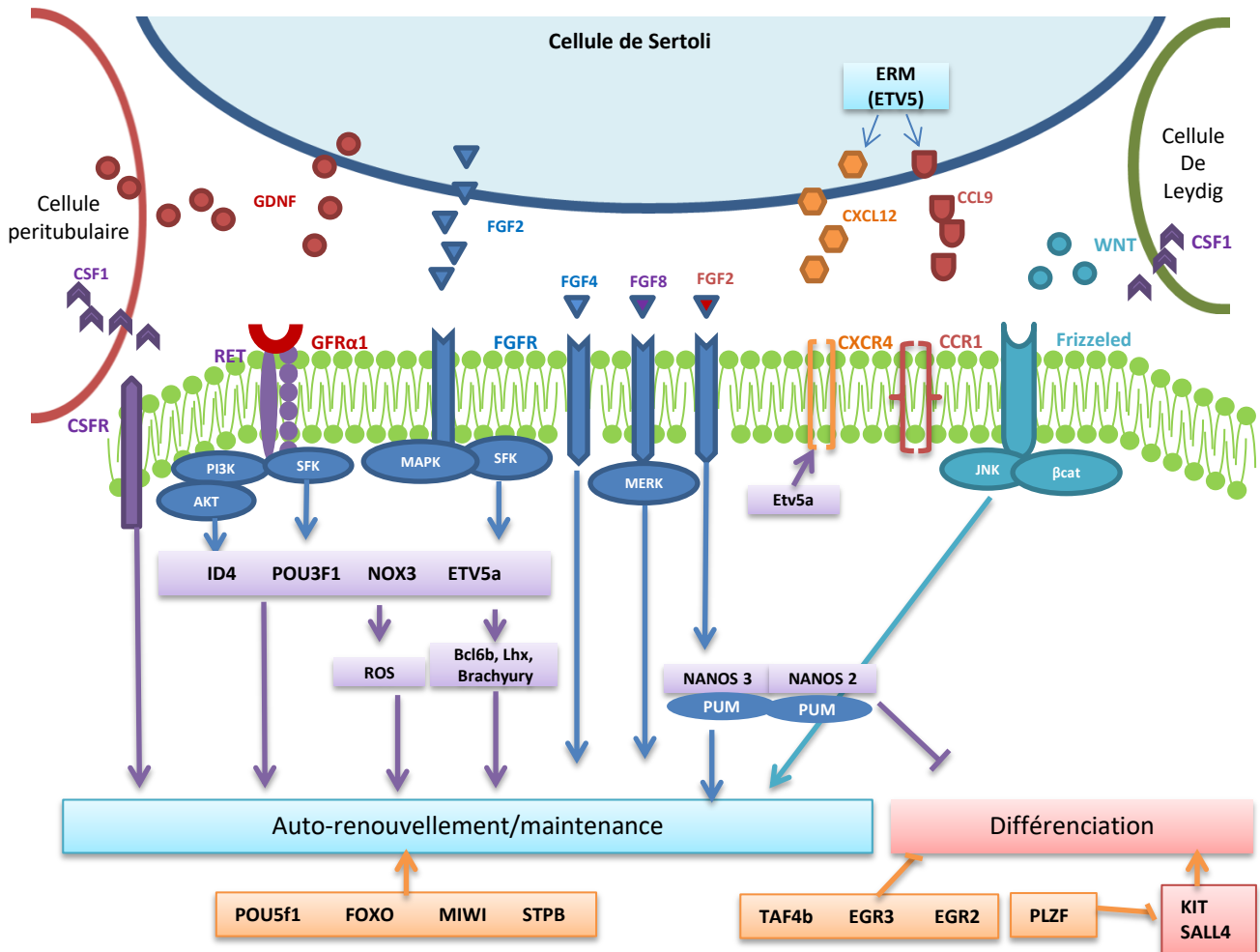
informations ont été mises à jour via les travaux de Yu en 2016 qui a réalisé un crible à large échelle des ARN d'interférences au niveau du testicule de drosophile. Ils ont mis en avant 29 membres de complexe d'épissage de l'ARN et 18 protéines de complexe de protéolyse impliqués uniquement dans l'auto-renouveau des cellules germinales. 27 autres facteurs dont 9 sont des protéines ribosomales, 4 sont impliqués dans l'épissage des ARNm et 3 font partie de complexe de traduction Eif3 semblent apparemment aussi impliqués dans l'auto-renouveau mais aussi dans la différenciation des GSC. (Yu et al., 2016).

## **6.1.2. Mammifères**

### **6.1.2.1. Facteurs paracrines**

#### **La voie GDNF/GFRA1**

Le GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor) est un facteur sécrété par les cellules de Sertoli et les cellules peritubulaires myoïdes (Chen and Liu, 2015; Spinnler et al., 2010). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent qu'il joue un rôle majeur dans le renouvellement du stock des cellules souches germinales chez l'animal pubère (Tadokoro et al., 2002). Lors d'un déficit en GDNF, on remarque un épuisement des réserves de cellules souches germinales, alors que lors d'une surexpression il y a une forte accumulation de spermatogonies indifférenciées au sein des tubes séminifères. La quantité de Gdnf produit dans la niche a donc une influence sur la spermatogenèse et participe à la régulation du devenir des SSC (Meng et al., 2000). L'action du GDNF passe par sa liaison à un récepteur transmembranaire appelé GFRA1. Le complexe ainsi formé va recruter un autre récepteur membranaire appelé RET. La suppression des co-récepteurs GFRA1 ou RET provoque une réduction du nombre de spermatogonies indifférenciées et conduit à la déplétion des cellules germinales (Oatley et al., 2011a). La présence de GDNF et de son récepteur sous forme soluble est indispensable pour l'amplification *in vitro* des SSC de mammifères incluant la souris, l'homme et le lapin (Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Kubota et al., 2011; Sadri-Ardekani et al., 2009). L'activation du corécepteur RET va initier une cascade de signalisations secondaires impliquant les PI3K/AKT, SFK, MAP2K1 (figure 20) et *in fine* l'expression de nombreux facteurs



**Figure 20 : Voies de régulation paracrines impliquées dans la maintenance et le devenir des SSC chez la souris :** Csf1 sécrété par les cellules péritubulaires et de Leydig va se fixer sur son récepteur Csf1r au niveau des SSC. Gdnf/Ret/Gfra1 active les voies PI3K/AKT et SFK et influence la transcription de facteurs tels que Id4/Pou3f1/Nox3/Etv5a. Fgf2 active lui des voies MAPK et SFK agissant sur l'autorenouvellement via la régulation de Etv5a qui lui-même régule Bcl6b, Lhx1 et Brachyury. Fgf4 active l'autorenouvellement via une voie encore non identifiée. Fgf8 active la voie ERK. Fgf2 va agir sur Nanos3 et Nanos2. Cxcl12 et Ccl9 qui sont régulés via les ERM au niveau de la cellule de Sertoli vont pouvoir être sécrétés pour se lier à leurs récepteurs respectifs Cxcr4 et Ccr1 pour réguler l'autorenouvellement. Wnt va se lier à son récepteur Frizzled, activer les voies JNK et β-caténine pour stimuler l'autorenouvellement. On retrouve aussi un grand nombre de facteurs de régulation intracellulaire comme Pou5f1/Foxo/Miwi/Stpb qui vont stimuler directement l'autorenouvellement et des facteurs comme Taf4b/Egr3/Egr2/Plzf qui vont eux inhiber la différenciation.

de transcription comme ID4 (Inhibitor of Dna Binding 4), POU3F1, et ETV5A (ETS Variant5) (Ishii et al., 2012; Lee et al., 2007; Takashima et al., 2015)

ID4 est un répresseur transcriptionnel qui a la capacité de promouvoir le caractère souche des cellules en inhibant les facteurs de transcription de la famille des Helice-boucle-helice (bHLH) connus pour promouvoir la différenciation (Song and Wilkinson, 2014) et la prolifération cellulaires (Zebedee and Hara, 2001). Des souris ID4-déficiantes ont montré une perte progressive des spermatogonies indifférenciées à l'âge adulte. *In vitro*, la déplétion d'ID4 chez la souris entraîne la stérilité mais n'affecte pas la survie des SSC (Oatley et al., 2011b).

POU3F1 (POU Class 3 Homeobox 1) aussi appelé Oct6 est lui aussi fortement lié au renouvellement des SSC puisque son inhibition, par l'intermédiaire d'ARN interférent (ARNi), entraîne une réduction du nombre de SSC en culture. Il est activé via le Gdnf et la voie PI3K (Wu et al., 2010).

ETV5, qui est activé via la voie de signalisation SFK (Chen et al., 2005) (Chen et al., 2005), va lui réguler d'autres facteurs de régulation comme BCL6B, LHX et BRACHYURY. BCL6B (B-Cell CLL/Lymphoma 6B) est un répresseur transcriptionnel en doigt de zinc, LHX (LIM Homeobox 3) est un facteur de transcription de type LIM et BRACHYURY est un facteur de transcription de la famille T-box. Ces 3 facteurs ont été impliqués dans l'autorenouvellement des SSC (Oatley et al., 2006; Wu et al., 2011). En plus de ces facteurs de transcription, Etv5 pourrait agir via son action directe sur le couple CXCR12 et CXCL4 (figure 20), qui lui aussi est très important dans l'auto-renouvellement des SSC (Wu et al., 2011).

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species), plutôt réputés comme toxiques pour les cellules germinales différenciées, stimulent l'auto-renouvellement des SSC lorsque leur taux reste modéré. L'exposition des SSC aux ROS augmente l'expression de NOX3 (Nadph Oxidase 3) qui est également induit transitoirement après la stimulation des SSC par un mélange GDNF et FGF2. NOX3 est une oxydase du NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate) dont l'action génère des dérivés superoxydes (Bedard and Krause, 2007). Ainsi, l'action de GDNF et de FGF2 pourrait aussi passer par la production d'un stress oxydatif modéré favorable au renouvellement des SSC (Morimoto et al., 2013, 2015).

### **La voie des FGF/FGFR**

Plusieurs études chez l'homme suggèrent que des mutations des récepteurs pour les molécules de la famille des FGF entraînent une expansion clonale des SSC (Bellus et al., 1995, Goriely et al., 2005).

Le facteur FGF2, également appelé basic FGF (bFGF) favorise la survie et la prolifération des SSC *in vitro* (Kanatsu-Shinohara and Shinohara, 2013; Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Van Dissel-Emiliani et al., 1996). Ce facteur FGF2 est sécrété par de nombreuses cellules testiculaires incluant les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et des cellules germinales en différenciation (Han and Martin, 1993; Mullaney and Skinner, 1992). La fixation de FGF2 sur son récepteur conduit à l'activation de facteurs comme ETV5 et BCL6B via l'activation de la voie de signalisation des MAP2K1 (Ishii et al., 2012). Cependant, une étude plus récente propose au contraire que FGF2 agirait de manière indépendante des voies de signalisation secondaires PI3K/AKT et MAP2K1-2 qui sont normalement stimulées par le GDNF (Takashima et al., 2015). De manière surprenante, la déplétion de FGF2 *in vivo* dans le testicule de souris entraîne une augmentation du stock de SSC mais aussi une augmentation du niveau d'expression de GDNF (Takashima et al., 2015). Il semble donc qu'un équilibre existe entre les niveaux d'expression de *Gdnf* et de *Fgf2* pour supporter le renouvellement du stock de SSC *in vivo*.

D'autres membres de la famille des FGF pourraient également être impliqués dans la régulation du renouvellement des SSC. Le facteur FGF8, sécrété par les cellules germinales a lui aussi été mis en évidence comme étant important dans le maintien des SSC via sa liaison au récepteur FGFR1 et à l'activation de la voie de signalisation MERK (Hasegawa and Saga, 2014). De même, la surexpression de FGF4 dans le testicule de souris accélère la régénération des SSC après l'induction d'une perte massive de ces dernières (Yamamoto et al., 2002). Enfin FGF9, lui, conduit à la régulation de facteurs de la famille Nanos. Les protéines NANOS 1, 2 et 3 forment une famille de protéines en doigt de zinc, et sont les homologues mammaliens du gène Nos initialement identifié chez la drosophile. Seules les protéines NANOS 2 et 3 sont spécifiquement impliquées dans la gamétogenèse. Des souris KO pour NANOS2 ont montré une perte totale des cellules germinales uniquement chez le mâle, alors que pour NANOS3 cette perte est observée à la fois chez le mâle et la femelle (Tsuda et al., 2003). NANOS 3, en interagissant avec PUMILIO2 (PUM2) pourrait réprimer la traduction protéique. Cela maintiendrait les cellules dans un statut indifférencié en agissant sur le cycle cellulaire et en

prolongeant la transition en phase G1 (Beer and Draper, 2013; Lolicato et al., 2008). Des études histologiques précises ont mis en évidence que la perte des cellules germinales observée dans les souris KO pour NANOS 2 était due à une déplétion en SSC. A l'inverse une surexpression de NANOS 2 entraîne une augmentation des spermatogonies indifférenciées et une diminution des spermatogonies différenciées (Sada et al., 2009). Cela pourrait indiquer que NANOS 2 est un répresseur de la différenciation méiotique. Il maintiendrait la répression de la méiose en empêchant l'expression de *Stra8* (Stimulated By Retinoic Acid 8) qui est nécessaire à la réplication de l'ADN des cellules spermatogoniales pré méiotiques, après la diminution de CYP26b1 (Cytochrome P450 Family 26 Subfamily B Member 1) (Sada et al., 2009). NANOS 2 interagirait également avec PUMILIO 2 (Barrios et al., 2010) comme indiqué sur la figure 20.

### **Les voies de signalisation WNT**

Les molécules de la famille des WNT sont des glycoprotéines sécrétées et leur implication dans les processus de communication intercellulaire et de maintien des propriétés souches des cellules est bien conservée au cours de l'évolution (Clevers et al., 2014). Les facteurs de type WNT stimulent plusieurs voies de signalisation. L'une d'entre elles est dite canonique et son action stabilise le facteur de transcription  $\beta$ -caténine qui peut alors activer la transcription de gènes cibles. La voie de signalisation WNT non canonique regroupe d'autres voies de signalisation incluant la voie PCF (planar cell polarity) ou WNT-JNK (Jun N-terminal kinase), la voie calcique et la voie d'importation nucléaire des récepteurs Fz. Le facteur WNT5a est une glycoprotéine produite et sécrétée par les cellules de Sertoli. Cette molécule, qui active la voie de signalisation non canonique, stimule l'accumulation des SSC *in vitro* en diminuant leur apoptose (Yeh et al., 2011). Cette action est inhibée par l'utilisation d'un antagoniste spécifique de la voie WNT-JNK. Des études récentes ont montré que la prolifération des spermatogonies indifférenciées (incluant les SSC et des progéniteurs) pouvait aussi être régulée par la voie canonique WNT/ $\beta$ -caténine (Takase and Nusse, 2016). L'inactivation ciblée de la  $\beta$ -caténine n'entraîne pas une diminution des SSC GFR $\alpha$ 1+ mais la prolifération des spermatogonies indifférenciées exprimant *plzf* est fortement diminuée. Enfin, les auteurs montrent que WNT6 pourrait être l'activateur endogène de la voie WNT/ $\beta$ -caténine car il est exprimé dans les cellules de Sertoli en contact avec les spermatogonies



indifférenciées. En accord avec ces observations, il a été montré que WNT3a (signalisation canonique et non canonique) et WNT10b (signalisation canonique) pouvaient stimuler la prolifération de la lignée cellulaire de SSC murine C18-4 (Golestaneh et al., 2009) (Figure 20).

### **La voie CSF1/CSFR**

La cytokine CSF1 (colony stimulator factor 1), est produite par les cellules de Leydig et les cellules myoïdes péri-tubulaires (Oatley et al., 2009). Elle régule la survie, la prolifération, la différenciation des phagocytes mononucléaires et stimulerait aussi les proliférations des spermatogonies GFR $\alpha$ 1+, *in vitro*, à savoir les spermatogonies As et Apr. Ce facteur de croissance pourrait être un facteur important dans l'établissement de la niche et entreprendrait l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation (Ryan et al., 2001) (figure 20).

### **Le rôle des chemokines.**

L'analyse de souris dont les ERM (ets related molecule) ont été perturbées montre une perte totale des cellules germinales. Or une analyse précise des gènes impactés par cette perturbation fait ressortir des cytokines comme CXCL12, CXCL5, et CCL7 ce qui sous-entend un rôle essentiel des chémokines dans le maintien des SSC (Chen et al., 2005). Les cellules de Sertoli secrètent effectivement des chémokines comme CXCL12. Cette molécule va pouvoir réagir avec son récepteur CXCR4 qui est présent au niveau de la membrane des SSC (figure 20). Des expériences utilisant des inhibiteurs de cette voie de signalisation ont mis en évidence une perturbation de l'autorenouvellement des SSC conduisant à la perte des cellules germinales (Yang et al., 2013) et à une diminution de l'abondance du transcrit *fgf2*. Or FGF2 et GDNF ont eux-mêmes un rôle de régulateur de cette voie de signalisation. On est donc en présence d'une sorte de boucle de régulation qui a pour rôle de maintenir les SSC. Enfin on peut aussi faire une hypothèse sur l'implication du couple CCL9/CCR1, qui est montré comme une cible principale des ERM et pourrait donc être potentiellement impliqué dans le renouvellement des SSC (Simon et al 2010).

### **6.1.2.2. Facteurs intracellulaires**

#### **6.1.2.2.1. Activateurs de l'auto-renouveaulement**

Le gène *Pou5f1* (POU Class 5 Homeobox 1) ou *Oct4* (Octamer-Binding Protein 4) code pour un facteur de transcription essentiel au maintien des propriétés de pluripotence et à la prolifération des cellules souches embryonnaires (Nichols et al., 1998). Ce gène est retrouvé exprimé dans de nombreuses cellules souches chez l'embryon et l'adulte et en particulier dans les PGC, les gonocytes et les spermatogonies indifférenciées (Pesce et al., 1998; Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990).

Le gène *Foxo1* est un facteur de transcription impliqué dans de très nombreux processus comme le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Zhang et al., 2011) et l'homéostasie des cellules souches (Farmer, 2003; Tothova and Gilliland, 2007). Il est retrouvé spécifiquement dans les gonocytes et les SSC chez la souris. Un déficit combiné de FOXO1, FOXO3 et FOXO4 entraîne une grave altération de l'auto-renouveaulement des SSC et un blocage de la différenciation. L'inactivation de la protéine PDK1 (protéine 3-phosphoinositide-dépendante kinase1) et de la protéine PTEN (phosphatase et tensin homologue) dans la lignée germinale mâle, a démontré que la voie de signalisation PI3K-akt régulait la stabilité de FOXO1 et sa localisation subcellulaire. FOXO1 régule aussi des gènes important dans la maintenance des SSC comme c-RET et LHX1 (Goertz et al., 2011).

Le gène murin *Miwi* code pour l'orthologue du gène *piwi* initialement identifié chez la drosophile. PIWI est une protéine de liaison à l'ARN de la famille des argonautes spécifiquement exprimée dans la lignée germinale. L'inactivation de ce gène chez la souris entraîne clairement un blocage de la méiose et de la spermiogénèse mais une perte progressive des cellules germinales est également observée au cours du vieillissement des individus. La protéine PIWI pourrait donc aussi avoir un rôle dans l'auto-renouveaulement des cellules germinales chez les mammifères (Carmell et al., 2007).

La PB-cadhérine appelée STPB-C serait impliquée dans le renouveaulement des SSC (figure 20) en activant la cascade de signalisation JACK-STAT et PI3K/AKT (Wu et al., 2008).

#### **6.1.2.2.2. Les inhibiteurs de la différenciation**

*Plzf* (promyelocytic leukemia zinc finger protein) également appelé *Zbtbn16* (Zinc Finger And BTB Domain Containing 16) est un gène, qui code pour un facteur de répression de la transcription. Il est exprimé par les spermatogonies indifférenciées, des spermatogonies  $A_s$  aux  $A_{al}$ . Des études ont clairement montré que les spermatogonies murines dépourvues en PLZF ne peuvent plus initier de nouvelles vagues spermatogénétiques après leur transplantation dans un animal receveur (Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004). L'une des cibles d'intérêt de PLZF serait le gène codant pour le récepteur c-Kit dans les spermatogonies précoces (Filipponi et al., 2007). c-KIT étant impliqué dans la différenciation des spermatogonies, la répression de la transcription du gène *c-kit* par PLZF pourrait empêcher la différenciation des spermatogonies indifférenciées en spermatogonies différenciées. Plus récemment, il a été montré que la protéine PLZF pouvait interagir physiquement avec la protéine SALL4. SALL4 est considéré comme un acteur clé de la régulation de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Lim et al., 2008)(Lim et al., 2008). Cependant, si SALL4 est exprimé dans différents tissus au cours du développement précoce (en particulier dans les PGC), son expression devient restreinte aux spermatogonies indifférenciées chez l'adulte avec un patron d'expression similaire à celui de PLZF (Durcova-Hills et al., 2008; Kohlhase et al., 2002). SALL4 active l'expression de c-KIT et par conséquent il doit être aussi considéré comme un acteur potentiel de la différenciation des spermatogonies. L'interaction de SALL4 avec PLZF qui conduit à un déplacement des sites de liaison à la chromatine de SALL4 pourrait diminuer l'expression de c-KIT et donc empêcher la différenciation des spermatogonies.

TAF4b (TBP-associated Factors 4b) est un composant du facteur de transcription IID (TFIID) faisant lui-même partie du complexe de pré-initiation de l'ARN polymérase II. Il est présent dans les cellules de la granulosa de l'ovaire et il est impliqué dans la folliculogénèse (Freiman et al., 2001). Les souris males KO pour ce gène vont naître fertiles, mais une perte progressive des cellules germinales est observée avec le temps (Falender et al., 2005). En absence de TAF4b, on remarque soit un déficit total de cellules germinales, soit des générations manquantes de cellules progénitrices de la spermatogénèse au sein des tubes séminifères chez les souris adultes. Ces résultats suggèrent que les cellules progénitrices ( $A_s$  et  $A_{pr}$ ) de la

spermatogénèse ont tendance à se différencier au détriment de leur participation à l'auto-renouvellement des SSC (Lovasco et al., 2015).

EGR3 et EGR4, Early Growth Response family, sont des régulateurs de transcription qui semblent être impliqués dans l'inhibition de la différenciation (O'Donovan and Baraban, 1999; Tourtellotte et al., 1999). Des expériences montrent une expression de EGR3 dans des spermatogonies isolées ou en paires, et une perte de l'expression de cet EGR3 lors de la différenciation de ces cellules (Hamra et al., 2004).

### **6.1.3. Poissons**

Chez les poissons, les voies de signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement des SSC restent mal connues car la plupart des études réalisées pour étudier le contrôle des proliférations goniales ne distinguent pas clairement les différentes populations de spermatogonies. D'autre part, il existe peu d'études fonctionnelles. Cependant, plusieurs études, notamment sur l'anguille, la truite, le médaka ou le poisson-zèbre, ont permis de mettre en avant de nouvelles voies originales de régulation paracrine très probablement impliquées dans le renouvellement des SSC mais aussi la conservation potentielle de certaines voies de régulation préalablement identifiées chez les mammifères (figure 21).

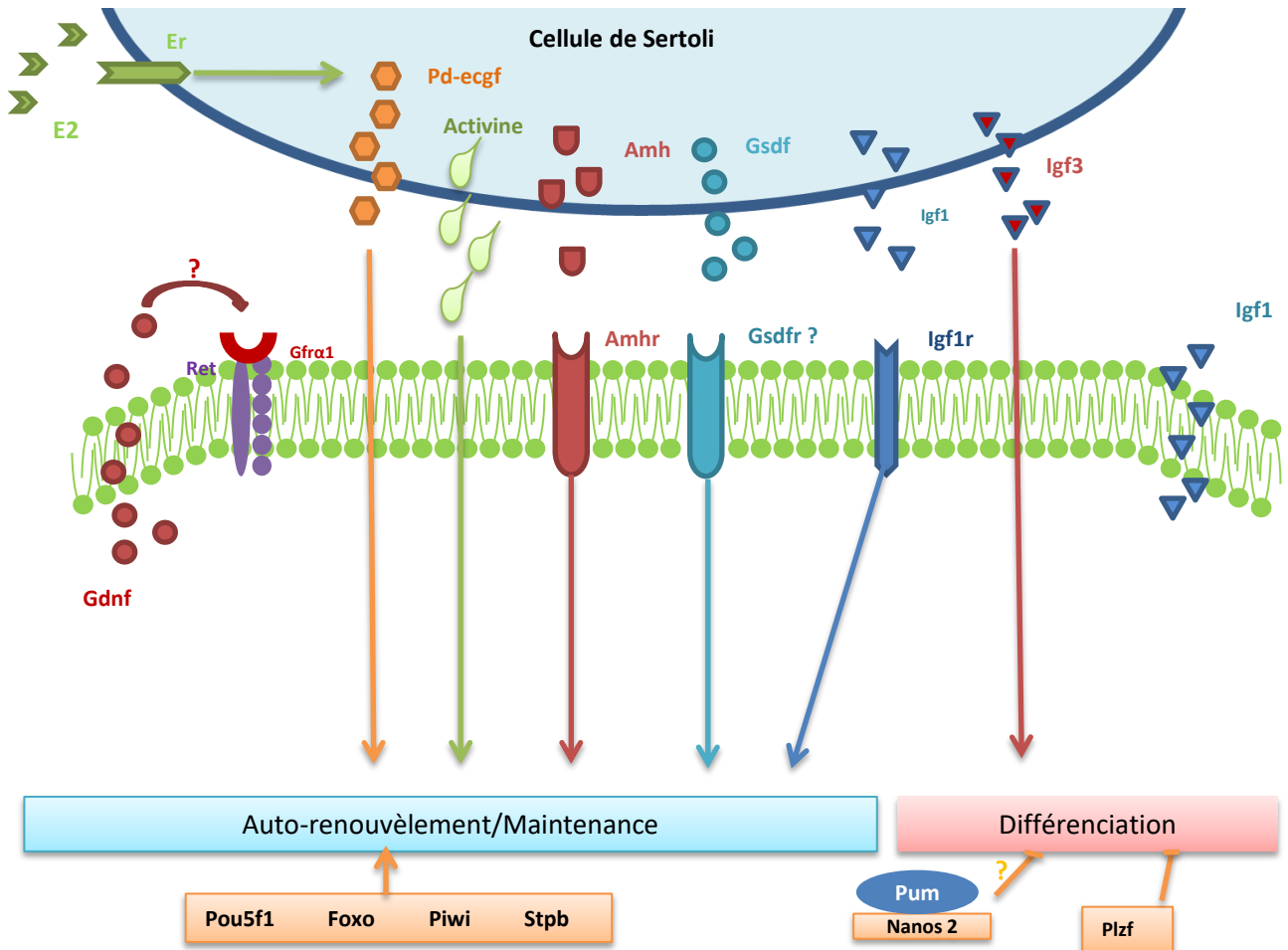
#### **6.1.3.1. Facteurs paracrines**

##### **La voie de PD-ECGF**

L'E2 stimule l'expression par les cellules de Sertoli d'un gène homologue au *Pd-ecgf* mammalien et nommé *eSR34* (figure 21). L'exposition de cultures d'explants testiculaires avec la protéine recombinante *eSR34* stimule les mitoses spermatogoniales (Miura et al., 2003).

##### **La voie de l'Amh (Anti-mulerian hormone)**

Chez l'anguille, une substance impliquée dans l'inhibition de la progression spermatogénétique a été identifiée. Cette protéine appelée initialement *eSRS21* (eel spermatogenesis Related Substance 21) montre une homologie de séquence de 40% avec l'Amh mammalienne. Elle est également exprimée par les cellules de



**Figure 21 : Voies de régulation paracrines impliquées dans la maintenance et le devenir des SSC chez le poisson-zèbre :** Le Gdnf présent au niveau de la SSC pourrait agir sur le récepteur Gfra1/Ret au niveau de la membrane et ainsi participer à l'autorenouveaulement. Le Pd-ecgf sécrété par la cellule de Sertoli via l'action de l'estradiol (E2) va pouvoir participer, comme pour l'activine, l'Amh, le Gsdf et l'Igf1 au maintien du pool de SSC par activation de l'autorenouveaulement. L'Igf3 lui semble plus impliqué dans les processus de différenciation. Les facteurs intracellulaires comme Pou5f1/Foxo/Piwi et Stpb sont comme chez les mammifères importants pour l'autorenouveaulement, alors que Nanos2 et Plzf vont eux inhiber la différenciation.

Sertoli (figure 21). L'augmentation de l'Amh permet d'inhiber la prolifération spermatogoniale induite par la 11KT (11-Ketotestosterone), et favoriserait l'auto-renouvellement par rapport à la différenciation (Miura et al., 2002; Morinaga et al., 2007; Skaar et al., 2011). La présence de l'Amh et de son récepteur a aussi été mise en évidence chez d'autres espèces de poissons comme le poisson-zèbre via des cultures organotypiques (Skaar et al., 2011), le bar (Rocha et al., 2016) ou encore le medaka, via l'étude d'une souche appelée Hotei, qui possède une mutation au niveau du récepteur à l'Amh (*Amhr2*) (Morinaga et al., 2007). Le gène codant pour le récepteur de l'Amh de type 2 est exprimé dans les cellules de Sertoli chez le médaka. L'action négative de l'Amh sur les proliférations spermatogoniales serait donc indirecte. De manière surprenante, le gène codant pour ce récepteur est absent chez le poisson-zèbre. Etant donnée la spécificité relative des récepteurs aux TGf beta, il est possible que l'action de l'Amh passe par un autre type de récepteur présent à la surface des spermatogonies ou non. L'inhibition de l'aromatase induit une réduction de la synthèse d'œstradiol endogène entraînant une modification de l'expression de l'Amh chez le poisson-zèbre, le Japanese flounder; pejerrey; fathead minnow and black porgy) mais pas chez le medaka et *Kryptolebias marmoratus* (Pfennig et al., 2015). L'Amh semble aussi être régulée par l'action de la Fsh, puisque l'utilisation de protéines recombinantes *in vivo*, ou le traitement d'explants testiculaires, montre une inhibition de l'Amh chez l'anguille, le seabass, la truite ou le poisson-zèbre (pour revue Pfennig et al., 2015). Cependant, le mode d'action de la Fsh semble indépendant de la synthèse des androgènes. En effet, aucun impact de la 11KT sur le niveau d'expression du transcrit *amh* n'a été observé (Sambroni et al., 2013a; Skaar et al., 2011). En revanche la DHP pourrait induire une augmentation du transcrit *amh* dans les testicules (Chen et al., 2013).

### **La voie du Gsdf**

Le gène *gsdf* (Gonadal soma derived growth factor), est un membre de la famille des TGFb (Transforming growth factor beta) exprimé majoritairement par les cellules de Sertoli en contact avec les spermatogonies indifférenciées (figure 21) chez de nombreuses espèces de poissons comme la truite (Mazurais et al., 2005; Sawatari et al., 2007), le medaka (Shibata et al., 2010; Gautier et al., 2011), le poisson-zèbre (Gautier et al., 2011a) ou encore le pagre à nageoires jaunes (Chen et al., 2015). La conservation du patron d'expression suggère que ce facteur a un rôle

bien conservé chez les différentes espèces de poissons téléostéens. Chez la truite, Gsdf est nécessaire à la survie des PGC et augmente l'activité mitotique des spermatogonies chez l'animal prépubère (Sawatari et al., 2007). De plus, récemment des travaux réalisés chez le tilapia ont démontré que ce gène serait aussi impliqué dans la régulation négative du gène *dmrt1* qui est lui impliqué dans la différenciation des spermatogonies (Jiang et al., 2016). Quoiqu'il en soit, des études plus approfondies seront nécessaires pour comprendre son mode d'action et en particulier l'identification et la localisation cellulaire de son(es) récepteur(s) membranaire(s) sur les SSC ou sur les cellules de Sertoli.

### **La voie du Gdnf/Gfra1**

De nombreuses observations suggèrent que cette voie de régulation paracrine majeure chez les mammifères pourrait aussi être conservée chez les poissons (figure 21). L'expression d'un gène orthologue potentiel du Gdnf mammalien a été identifiée dans les spermatogonies indifférenciées chez le tilapia (Santos Nassif Lacerda et al., 2013a), et la truite (Bellaïche et al., 2014; Nakajima et al., 2014). L'expression de gènes orthologues du récepteur Gfra1 mammalien a été identifiée dans ces cellules non seulement chez les poissons téléostéens mais aussi chez la roussette, un poisson cartilagineux bien plus primitif (Bosseboeuf et al., 2014). Chez la roussette, bien que l'expression de *gdnf* n'ait pas pu être mise en évidence dans la zone germinative des testicules, le GDNF humain permet la prolifération et le maintien des SSC *in vitro* (Gautier et al., 2014). Il n'existe à ce jour aucune étude fonctionnelle publiée chez les poissons osseux.

### **La voie des Igf**

Igf1 (Insulin Like Growth Factor 1) est connu pour être le médiateur des hormones de croissance chez les vertébrés. Chez la truite, il est exprimé dans les cellules de Sertoli et les cellules spermatogoniales et il se lie au récepteur Igf de type 1 (Le Gac et al., 1996). De plus, Igf1 stimule la synthèse d'ADN dans les spermatogonies (Le Gac et al., 1996; Loir, 1994; Loir and Le Gac, 1994). Igf1 est aussi nécessaire pour la régulation de la spermatogenèse chez l'anguille, il relaie le processus spermatogénétique induit par la 11KT (Nader et al., 1999). On le retrouve aussi chez le tilapia (Berishvili et al., 2006) et le bar japonais (Viñas and Piferrer, 2008). Igf1 est impliqué dans la prolifération des cellules germinales et la reprise

méiotique (figure 21) (Duan, 1998; Loir, 1994; Reinecke et al., 2005) et il stimule l'activité de l'aromatase (Kagawa et al., 2003; Weber et al., 2007).

Igf3 est un nouveau membre de la famille des Igf spécifique aux poissons osseux (Wang et al., 2008; Zou et al., 2009). Son expression est stimulée par la Fsh via la 11KT mais aussi par les hormones thyroïdiennes comme la triiodothyronine (T3). Igf3 est exprimé dans les cellules de Sertoli et il stimulerait la prolifération, la différenciation et l'entrée en méiose des spermatogonies indifférenciées chez le poisson-zèbre (Morais et al., 2013a; Nóbrega et al., 2015). Igf3 stimule aussi *cyp19a1a* et *cyp11b2* qui sont respectivement impliqués dans la production d'oestrogènes et d'androgènes (Li et al., 2012a).

### **L'activine B**

L'activine B est un facteur de croissance dimérique de la famille des TGF beta. Chez l'anguille japonaise, l'activine B est exprimée dans le testicule au moment de l'initiation de la spermatogenèse. Sa transcription et sa traduction sont induites par la 11KT. *In vitro*, l'activine B stimule la prolifération des spermatogonies mais pas l'entrée en méiose (Miura et al., 1995). Cette activine B, comme l'Igf, est impliquée dans la régulation des stades précoces de la spermatogenèse non seulement chez les poissons téléostéens mais aussi chez les mammifères (Li et al., 1997; Watanabe and Onitake, 1995; Zhao et al., 1996). Des investigations complémentaires seront encore nécessaires afin de confirmer le rôle de l'activine B chez d'autres espèces de poissons.

#### **6.1.3.2. Facteurs intracellulaires**

*oct4/pou5f1* : Le gène mammalien *Oct4* est issu de la duplication d'un gène ancestral appelé *pou2* qui a eu lieu chez les mammifères non placentaires. Cependant, la copie ancestrale *pou2* a été éliminée du génome des mammifères euthériens terrestres. En conséquence, il n'existe pas d'orthologue d'*Oct4* mammalien au sens strict du terme chez les poissons. Néanmoins, de nombreuses études ont considéré ce facteur *pou2* comme étant l'orthologue de l'*Oct4* mammalien. De manière intéressante, on peut noter que l'utilisation d'un anticorps anti-*pou5f1* de mammifère détecte un antigène dans les cellules spermatogoniales chez le tilapia (Huang et al., 2016; Santos Nassif Lacerda et al., 2013a) et que le

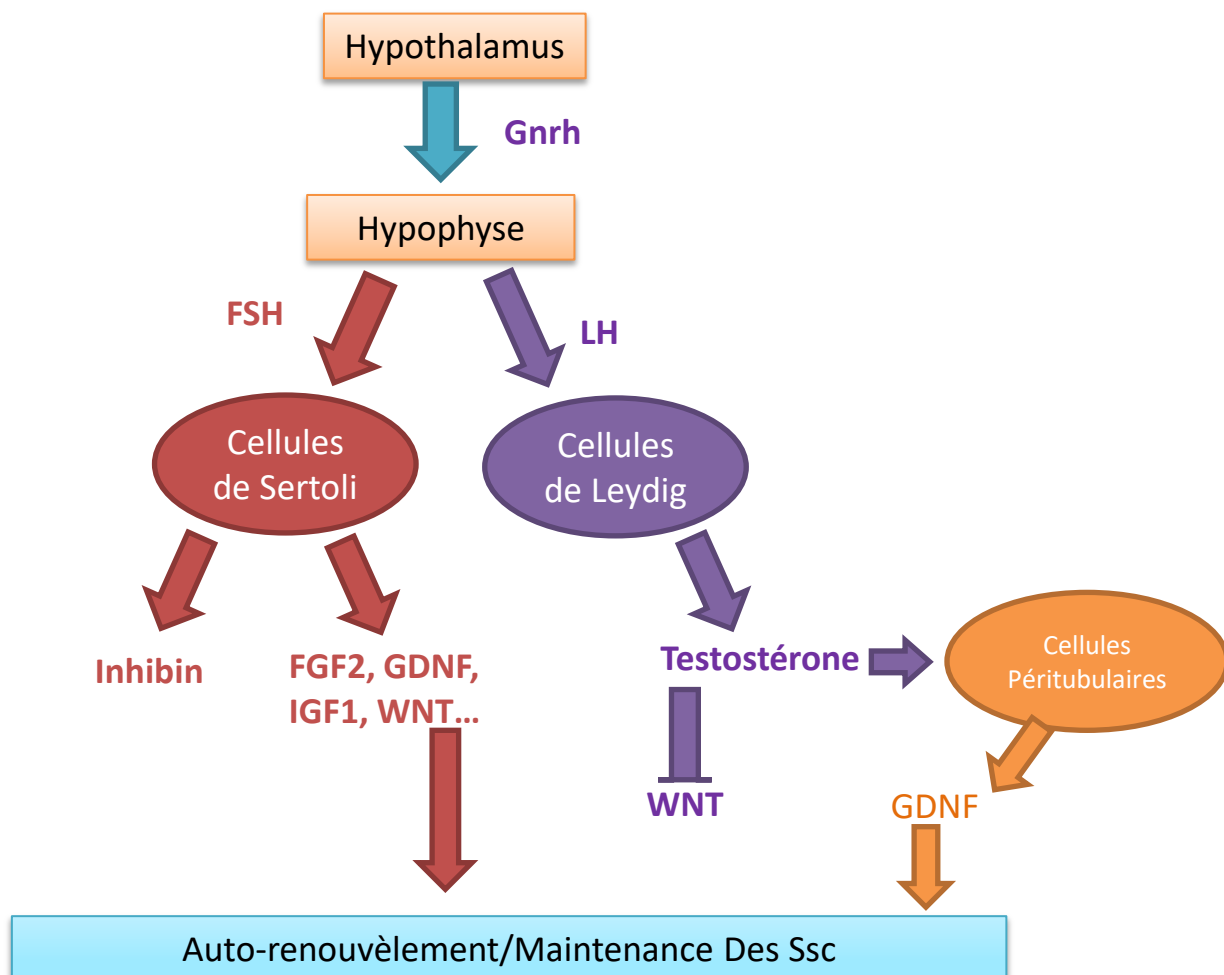


gène *pou2* est exprimé dans les spermatogonies indifférenciées chez le medaka (Froschauer et al., 2013; Sánchez-Sánchez et al., 2010), la truite (Bellaïche et al., 2014), la roussette (Bosseboeuf et al., 2014a) et le poisson chat (Shang et al., 2015). Comme pour Pou5f1/Oct4, les protéines possédant un domaine de type pou2 peuvent initier la pluripotence cellulaire à l'exception de la protéine Pou2 du poisson-zèbre (Tapia et al., 2012). En conséquence, l'importance de *pou2* dans le renouvellement des SSC de poissons reste à démontrer.

*plzf* : La localisation de la protéine *plzf* a été étudiée dans le testicule de poisson-zèbre à l'aide d'un anticorps anti-*plzf* de poisson-zèbre (Ozaki et al., 2011). Dans cette étude, Plzf est présent dans le noyau des cellules de spermatogonies indifférenciées et différenciées. Chez la Roussette, l'ARNm de *plzf* est détecté dans les spermatogonies indifférenciées et différenciées mais aussi dans les cellules méiotiques et les jeunes spermatides (Bosseboeuf et al., 2014). Enfin, une étude plus récente montre que *plzf* est préférentiellement exprimé dans les spermatogonies indifférenciées de truite sexuellement immature (Bellaïche et al 2014). On le retrouve aussi dans les spermatogonies indifférenciées chez le poisson chat (Shang et al., 2015). En conséquence, le rôle clé de ce facteur inhibiteur de la différenciation pourrait être conservé chez les poissons (figure 21).

*Piwi* : le gène *piwi* est dupliqué chez le poisson-zèbre et les différentes copies sont appelées *ziwi* et *zili*. La perte de *ziwi* entraîne la perte des cellules germinales (Houwing et al., 2008). *Ziwi et zili* collaborent pour stabiliser les piRNA requis pour le « silencing » des transposons. Chez le medaka, les gènes *piwi* seraient aussi impliqués dans la migration des PGC (Li et al., 2012b).

*nanos2* a été retrouvé exprimé dans les spermatogonies indifférenciées chez le tilapia (Santos Nassif Lacerda et al., 2013a), la truite (Bellaïche et al., 2014), le medaka (Aoki et al., 2009). Comme pour la voie Gdnf/Gfra1, son rôle exact dans le processus d'auto-renouvellement n'est pas démontré chez les poissons. Mais au vu de la conservation de son patron d'expression et de son rôle important chez les mammifères, on peut émettre l'hypothèse que son rôle pourrait être conservé chez les poissons. (Costa et al., 2012; Nagano and Yeh, 2013; Sada et al., 2012).



**Figure 22 : Voies de régulation endocrines impliquées dans la maintenance et le devenir des SSC chez la souris:**

Le GnRh secrétée par l'hypothalamus va permettre la production de FSH et de LH. La FSH agit sur la cellule de Sertoli qui va alors exprimer des facteurs comme FGF2/GDNF/IGF1/WNT qui activent des voies de régulation importantes pour l'autorenouveaulement des SSC. De son côté la LH va entrainer la production de stéroïde (Testostérone) par les cellules de Leydig. Cette testostérone va inhiber l'autorenouveaulement (via son action sur WNT) ou la stimuler en entrainant la production de GDNF par les cellules Pérítubulaires.

## **6.2. Régulation endocrine du renouvellement du stock de SSC**

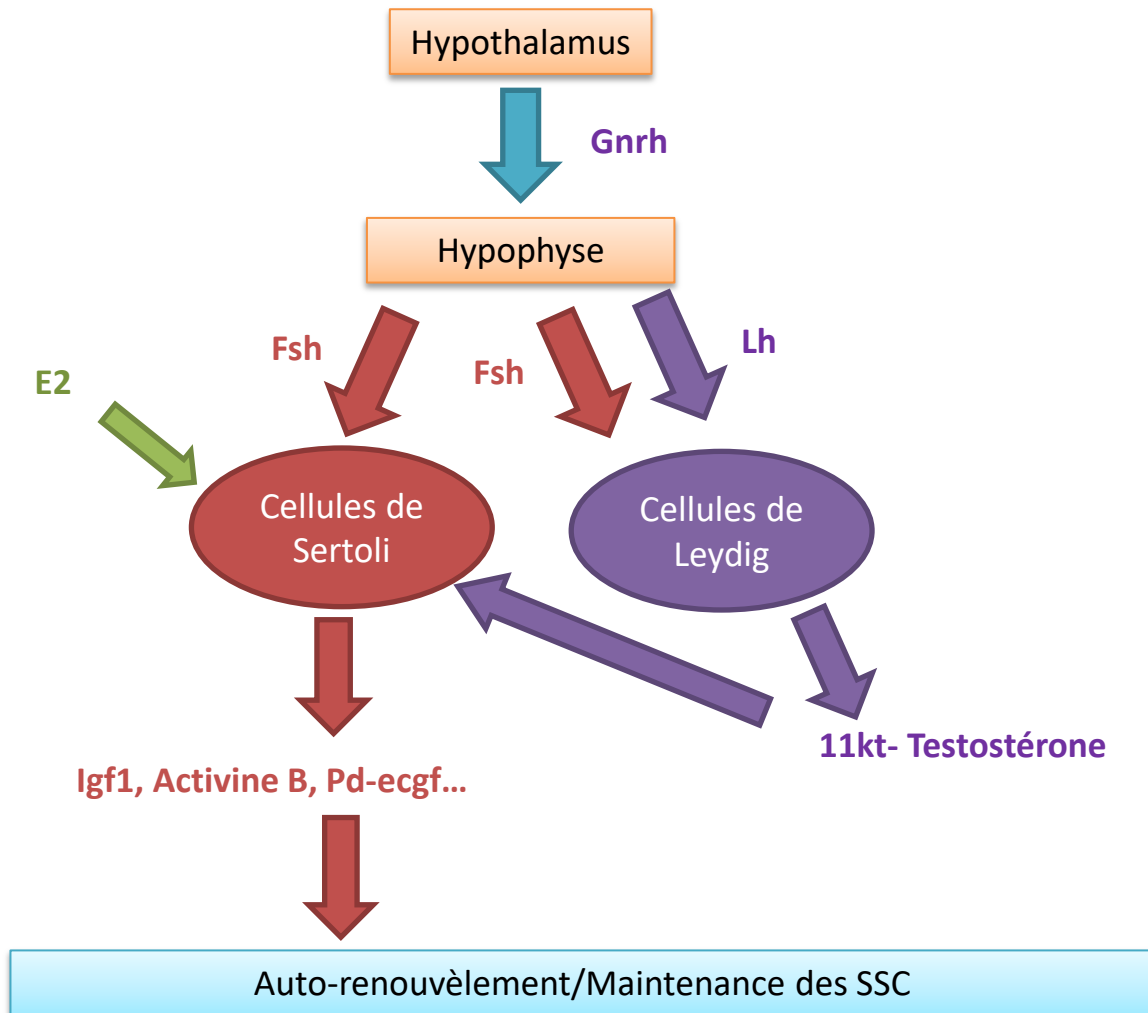
### **6.2.1. Gonadotropines**

#### **6.2.1.1. Mammifères**

L'activation du récepteur de la FSH localisé sur les cellules de Sertoli module l'expression de nombreux facteurs comme GDNF, FGF2, IGF1, l'inhibine et les activines (figure 22) (Barakat et al., 2008; Mullaney and Skinner, 1992; Pitetti et al., 2013; Tadokoro et al., 2002). La stimulation de l'expression des gènes *Gdnf* et *Fgf2* par la FSH laisse penser que cette dernière serait nécessaire au renouvellement des SSC. Cependant, il existe encore un certain nombre de doutes sur la réalité de cette régulation. En effet, l'absence de FSH ne semble pas perturber le maintien des SSC en culture (Kanatsu-Shinohara et al., 2012). D'autre part, des travaux récents réalisés par le groupe du Dr. Tanaka, utilisant des souris KO pour les récepteurs à la LH (Luteinizing Hormone) et à la FSH, ont mis en évidence que ces hormones ne seraient pas à l'origine de la régulation du GDNF (Tanaka et al., 2016). Les observations contradictoires sur le rôle des gonadotropines chez les mammifères montrent bien qu'il y a encore des incompréhensions sur les mécanismes régulant le devenir des SSC. L'analyse du transcriptome des cellules de Sertoli durant la spermatogenèse chez la souris, suggère aussi une relation entre la FSH et d'autres voies de régulation comme Hedgehog, Wnt ou Notch (Zimmermann et al., 2015).

#### **6.2.1.2. Poissons**

Chez les poissons, comme chez les mammifères, les gonadotropines Fsh et Lh, libérées dans le sang par les cellules gonadotropes de l'hypophyse, régulent les fonctions testiculaires (figure 23). Chez les salmonidés, la Fsh est la seule gonadotropine détectée dans la circulation sanguine des animaux mâles prépubères et son taux plasmatique augmente au moment de l'initiation de la puberté (Gomez et al., 1999). Ces observations laissent penser que son action pourrait constituer un signal pour stimuler le renouvellement et/ou le recrutement des SSC qui s'engagent dans un programme de différenciation spermatogénétique. Cependant, les poissons montrent plus de complexité dans le profil d'expression et la sélectivité des récepteurs aux gonadotropines (figure 23). Des travaux réalisés sur l'anguille (Ohta



**Figure 23 : Voies de régulation endocrines impliquées dans la maintenance et le devenir des SSC chez les poissons**

Le GnRh secrété par l'hypothalamus va permettre la production de Fsh et de Lh. La Fsh agit sur la cellule de Sertoli et sur les cellules de Leydig. Son action sur les cellules de Sertoli entraine l'expression de régulateurs de l'autorenouveaulement (Igf1,Activine,Pd-ecgf). L'action de Fsh et de Lh sur les cellules de Leydig entraine une expression de 11KT-Testosterone qui va pouvoir agir sur les cellules de Sertoli pour participer à l'expression des facteurs de renouvellement. L'Estradiol va lui aussi agir sur la cellule de Sertoli pour entraine l'expression de facteurs comme Pd-ecgf

et al., 2007) et sur le poisson-chat (García-López et al., 2009) ont mis en évidence la présence du récepteur à la Fsh (Fshr) au niveau des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig, alors que la localisation du récepteur à la Lh (Lhcgr) reste limitée aux cellules de Leydig. Un autre point de divergence avec les mammifères réside dans l'existence d'une certaine activation-croisée du récepteur Fshr par les deux gonadotropines. En effet, l'analyse de la sélectivité des récepteurs aux gonadotropines réalisées sur différentes espèces de poissons (Alok et al., 2000; García-López et al., 2009; Kazeto et al., 2008; So et al., 2005) a mis en évidence que le Fshr pouvait être activé préférentiellement par la Fsh mais aussi par la Lh. Le Lhcgr reste quant à lui activé spécifiquement par la Lh. Notons tout de même une exception importante concernant les salmonidés qui eux présentent une spécificité stricte de la Fsh et de la Lh pour leur récepteur respectif (Sambroni et al., 2007). Une analyse chez la truite, par puce à ADNc, a permis de mieux caractériser les facteurs susceptibles de relayer l'action de la Fsh et/ou de la Lh chez la truite prépubère (Sambroni et al., 2013b). La Fsh régule des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse mais aussi des gènes impliqués dans la survie, la prolifération et/ou la différenciation des cellules spermatogoniales comme l'*amh*, l'*Inhibine* ou l'*igf3* (figure 23). Certains de ces gènes sont directement régulés négativement (*amh*) ou positivement (*igf3*) par la Fsh indépendamment de la synthèse des stéroïdes (Sambroni et al., 2013a). D'autre part, des travaux complémentaires chez la truite ont montré que la Fsh régulait l'expression de l'un des gènes orthologues au Gdnf mammalien mais de manière inverse à celle décrite chez les mammifères (Bellaïche et al., 2014). Les modalités d'action de la Fsh sur le renouvellement des SSC pourraient donc être différentes chez les poissons. Dernièrement, une étude similaire a été réalisée chez le poisson-zèbre (Crespo et al., 2016). La Fsh apparaît clairement comme un facteur clef de la régulation de nombreux processus de la spermatogenèse. Cette étude confirme que la Fsh régule de nombreux membres de la famille des Tgf beta dont certains ont été impliqués dans la régulation du renouvellement et de la différenciation des SSC chez le poisson-zèbre comme l'*amh*. On retrouve également d'autres gènes décrits chez les mammifères comme étant impliqués dans ce processus comme *Wnt*, *hedgehog*, et *nodal*.

En conclusion, l'action négative de la Fsh sur l'expression de l'*amh* et du *gdnf* et son action positive sur le gène *Igf3* laisse penser que la Fsh est effectivement une

hormone clef qui participe à la régulation de l'équilibre subtil entre renouvellement et différenciation des SSC chez les poissons.

### **6.2.2. Stéroïdes sexuels**

La Fsh présente la même potentialité de stimulation de la stéroïdogénèse que la Lh chez les animaux mâles immatures. En effet, les deux hormones stimulent la production d'œstrogènes et d'androgènes par des explants testiculaires cultivés *in vitro* (Planas et al., 2000). Ces stéroïdes sexuels peuvent agir de manière paracrine ou endocrine (figures 22 et 23). Plusieurs études ont exploré leur effet sur les proliférations spermatogoniales ou leurs gènes cibles chez les mammifères et les poissons.

#### **6.2.2.1. Mammifères**

##### **Œstrogènes**

L'effet des œstrogènes sur le devenir des SSC a été très étudié sur des souris traitées au busulfan qui ne possèdent plus que des SSC comme cellules germinales. L'apport d'œstradiol aux souris traitées au busulfan permet de restaurer la spermatogénèse et son action est synergique avec la FSH (Jafarian et al., 2014; Zhou et al., 2011). Ces études suggèrent que les œstrogènes favorisent la différenciation des SSC plutôt que leur autorenewement.

##### **Testostérone**

La testostérone qui est sécrétée par les cellules de Leydig semblerait être impliquée indirectement dans l'autorenewement des SSC en agissant sur l'expression de GDNF. L'administration de testostérone exogène à des souris traitées au busulfan restaure la spermatogénèse. Il a été montré que la testostérone est capable de stimuler l'expression du *Gdnf* dans les cellules péri-tubulaires (Chen et al., 2016). De plus, lorsque l'expression de *Gdnf* est abolie dans ces cellules péri-tubulaires, les souris, encore fertiles après la puberté, deviennent progressivement stériles suite à la perte des spermatogonies indifférenciées (figure 22). Cependant, le rôle des androgènes pourrait être plus ambigu dans des conditions plus physiologiques. La testostérone régule négativement l'expression du facteur WNT5a

qui est aussi impliqué dans le renouvellement des SSC. Cette régulation négative a été confirmée par l'utilisation d'un anti-androgène comme le flutamide qui entraîne une augmentation de l'expression de WNT5A (Tanaka et al., 2016).

#### **6.2.2.2. Poissons**

##### **Oestrogènes**

Bien que l'estradiol soit connu pour être une hormone femelle, sa présence a été retrouvée chez les mâles de différents vertébrés (Betka and Callard, 1998; Fasano et al., 1993; Schlinger and Arnold, 1992). De plus l'expression de ses récepteurs nucléaires a été mise en évidence au niveau des gonades (Ciocca and Roig, 1995; Delalande et al., 2015; Mak and Callard, 1987). L'oestradiol-17 $\beta$  (E2) est un œstrogène naturel qui est retrouvé dans le sérum chez l'anguille et dont le récepteur est exprimé au niveau des cellules de Sertoli. Chez l'anguille, l'injection d'oestradiol-17 $\beta$  (E2) à des mâles immatures permet d'initier la spermatogenèse. De plus, l'E2 stimule la prolifération des spermatogonies indifférenciées dans des cultures d'explants testiculaires (Miura et al., 1999). Cet effet est inhibé par le tamoxifène qui est un antagoniste des récepteurs nucléaires aux œstrogènes. Des résultats similaires ont été démontrés chez une autre espèce d'anguille (Amer et al., 2001) et chez le medaka (Song and Gutzeit, 2003). L'action des œstrogènes semble relayée par un gène homologue au *Pd-ecgf* mammalien et nommé *eSR34* (figure 23). L'exposition des cultures d'explants testiculaires avec la protéine recombinante eSR34 stimule les mitoses spermatogoniales (Miura et al., 2003). Cependant, le rôle des œstrogènes pourrait être plus complexe car ils régulent des gènes impliqués dans le métabolisme de l'acide rétinoïque qui est lui connu pour être impliqué dans la différenciation des SSC chez la souris (Zhou and Griswold, 2008). L'administration d'œstrogènes semble diminuer l'expression de l'*amh*, ce qui pourrait leur donner un rôle dans le renouvellement des SSC comme proposé chez l'anguille (Miura et al., 1999).

##### **Testostérone**

La Lh et la Fsh régulent la production d'androgènes en se liant aux récepteurs Lh et Fshr présents à la surface des cellules de Leydig. Chez l'anguille, la 11-KT est nécessaire pour induire les proliférations goniales dans des explants testiculaires

cultivés *in vitro*. La Fsh agirait par ce biais sur la prolifération des spermatogonies comme mis en évidence chez le saumon (Campbell et al., 2003). L'utilisation d'inhibiteur de la stéroïdogénèse, et de Fsh recombinante a permis de préciser que le rôle sur la prolifération des spermatogonies serait lié à la production de 11-KT (Ohta et al., 2007). On sait que la 11KT pourrait être impliquée dans la régulation de l'activine ou de l'Igf1 (figure 23).

## **7. Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation spermatogonale**

### **7.1. Chez les invertébrés**

Chez les invertébrés, le processus de différenciation spermatogonale commence dès la division de la cellule germinale souche. En effet, les divisions symétriques ou asymétriques des cellules souches entraînent une perte de contact des deux cellules germinales ou seulement de l'une des deux cellules filles avec le HUB, respectivement. Cette perte de contact avec les cellules du HUB est primordiale dans le processus de différenciation. Le gonadoblaste n'étant plus en contact avec le HUB, il ne reçoit plus les signaux inhibiteurs de la différenciation. Ces cellules vont donc commencer à accumuler les facteurs de différenciation Bam (bag of marbles) et Bgcn (benign gonial cell neoplasm) (Gönczy et al., 1997; McKearin and Spradling, 1990). Notons aussi le rôle de certains microARN comme Mei-P26 (Neumüller et al., 2008; Page et al., 2000) qui régulent l'accumulation de Bam. Ce microARN est également une cible de la répression par Bam et Bgcn (Gönczy et al., 1997; McKearin and Spradling, 1990) dans les cellules germinales. Meip26 est donc impliqué dans le switch entre un état souche des SSC et le début de leur différenciation méiotique.

Les cellules germinales qui entrent en différenciation vont exprimer Spitz qui active à son tour le récepteur aux facteurs de croissance épidermiques (Egfr) au niveau des cellules du cyste. Ce signal va activer une cascade MapK dépendante qui va promouvoir la différenciation des cellules germinales à l'intérieur du cyste (Kiger et al., 2001; Tran et al., 2000).



Cette régulation de la différenciation des cellules germinales est bien sûr très complexe, et elle fait intervenir un plus grand nombre de facteurs dont le rôle reste à être précisé (Yu et al., 2016).

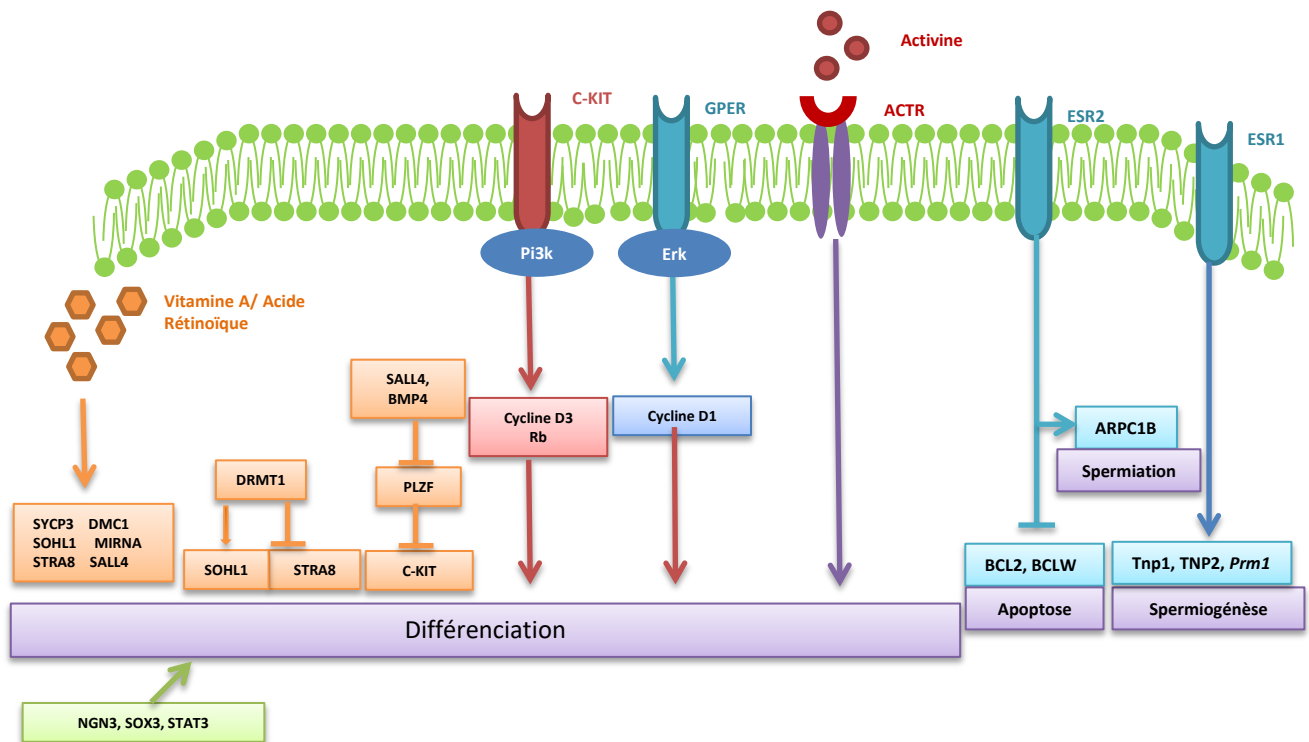
## **7.2. Chez les mammifères**

Le renouvellement des SSC est primordial pour le maintien à long terme de la spermatogenèse. Cependant, la production des gamètes implique aussi qu'une partie du stock de SSC s'engage dans la voie de la différenciation spermatogénétique. Ce processus va se dérouler en deux étapes. Dans un premier temps, on va avoir une différenciation des spermatogonies indifférenciées Aal en spermatogonies différenciées (A et B). Puis ces spermatogonies entameront une méiose conduisant à la formation des spermatocytes primaires.

### **L'acide rétinoïque**

Chez les mammifères, la différenciation spermatogoniale nécessite la production locale d'acide rétinoïque (RA pour retinoic acid) qui est un métabolite de l'oxydation de la vitamine A en rétinol (van Pelt and de Rooij, 1991; de Rooij, 2001; Wolbach and Howe, 1925). Des études ont démontré que, chez les souris carencées en vitamine A, les spermatogonies indifférenciées ne peuvent pas dépasser le stade de spermatogonies alignées ( $A_{al}$ ). L'acide rétinoïque est donc indispensable à la transition  $A_{al}/A1$  qui permet la différenciation des SSC en spermatogonies définitivement engagées dans la différenciation spermatogénétique (Hogarth and Griswold, 2013; Hogarth et al., 2011).

Les récepteurs RARg et RARa sont exprimés dans les cellules spermatogoniales indifférenciées. Des études basées sur l'invalidation de ces gènes chez la souris ont montré que ces récepteurs avaient une action redondante et qu'ils étaient responsables du phénotype caractérisé par l'absence de transition Aal/A1 (Gely-Pernot et al., 2015). De plus, l'analyse des mutants RARa/b/g<sup>spg<sup>-/-</sup></sup> et RXRa/b/g<sup>spg<sup>-/-</sup></sup> montre que ces animaux présentent le même phénotype ce qui suggère que RARg et RARa peuvent s'hétérodimériser pour induire l'expression des gènes cibles de RA. Il a été démontré que *stra8* était directement induit par RARg et RARa (Gely-Pernot et al., 2012) et que ce gène était impliqué dans l'initiation de la méiose (figure 24).



**Figure 24 : Voies de régulation paracrines impliquées dans la différenciation des SSC chez la souris:** L'acteur clef de cette régulation est l'acide rétinoïque qui va pouvoir moduler l'expression de nombreux facteurs de différenciation (SYCP3/SOHL1/STRA8/DMC1/MIRNA/SALL4). On retrouve aussi DMRT1 qui régule positivement SOHL1 et inhibe STRA8. Les facteurs SALL4 et BMP4 vont eux réguler négativement PLZF permettant ainsi l'expression de Kit. Le récepteur Kit via l'activation de la voie Pi3k permet la régulation de la cycline D3 et de RB. L'activine va elle aussi stimuler la différenciation après liaison à son récepteur. Les estrogènes vont avoir un rôle différent en fonction de leurs récepteurs. GPER active la voie ERK et module l'expression de la Cycline D1. Le récepteur ESR2 va réguler les mécanismes d'apoptose, et de spermiation, alors que ESR1 lui module la spermiogénèse.

L'étude des effets d'un agoniste spécifique de RAR $\gamma$  a permis de montrer que RA stimule également l'expression de *Sall4*. Rappelons ici que *Sall4* est un gène impliqué dans la différenciation des spermatogonies indifférenciées. En effet, SALL4 stimule indirectement l'expression de C-KIT (Hobbs et al., 2012) qui active à son tour, la voie PI3K/Akt et des facteurs de transcription comme la cycline D3 et RB (Feng et al., 2000). L'action de SALL4 pourrait impliquer PLZF car ces deux protéines interagissent physiquement. La liaison de SALL4 à la protéine PLZF pourrait empêcher cette dernière de se fixer au promoteur du gène *c-KIT*. La réalisation d'un grand nombre d'expériences utilisant des agonistes et antagonistes de la vitamine A (Biggs et al., 1999; Gallardo et al., 2007; Goertz et al., 2011) a permis de mieux identifier les facteurs impliqués dans la différenciation. On retrouve ainsi STRA8, SYCP3 (Synaptonemal Complex Protein 3) et DMC1 (DNA Meiotic Recombinase 1). L'acide rétinoïque régule également négativement l'expression des microARN MIRC1, MIRC3 et miR221/222 qui sont impliqués dans la régulation de la traduction des messagers *c-Kit*. De plus, l'acide rétinoïque régule positivement SOHL1 qui est un autre acteur la différenciation spermatogonale (figure 24).

SOHL1 est restreint aux cellules germinales pré-méiotiques (Rajkovic et al., 2001). Les souris dont l'expression de *Sohl1* a été bloqué par Knock-out montre une diminution de cellules spermatogoniales différenciées et une augmentation des cellules spermatogoniales indifférenciées (Ballow et al., 2006). Cependant chez les souris mutantes, il a été observé que malgré une forte baisse de cellules différenciées, une fraction de ces cellules restait présente après 7 semaines de vie de l'individu. Cette observation a conduit les auteurs à rechercher un autre facteur homologue pouvant suppléer au moins en partie la fonction de SOHL1. Le fait que le patron d'expression cellulaire de *Sohl2* soit semblable à celui de *Sohl1* et que son niveau d'expression soit deux fois supérieur à son niveau normal lorsque le gène *Sohl1* est inactivé, suggère que ce paralogue pourrait avoir une fonction similaire à *Sohl1* (Hao et al., 2008). Ces deux facteurs peuvent se lier au promoteur de leur paralogue (Suzuki et al., 2012). Chez les souris déficientes pour ces deux facteurs, une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le maintien du stock des SSC comme *Gfra1*, *Ret*, *Nanos2*, ou *Oct4* a été observée. De manière concomitante, l'expression des gènes codant pour des facteurs de différenciation comme *c-Kit*, *Ngn3* ou *Sox3* (Barrios et al., 2012; Mei et al., 2015) est en revanche

diminuée. DMRT1 (doublesex and mab3-related transcription factor-1) est connu pour son rôle dans la différenciation sexuelle de nombreuses espèces (Matsuda et al., 2002; Raymond et al., 2000; Zarkower, 2001). Les souris KO pour *Dmrt1* montre une initiation de la méiose et une expression de *stra8* trop précoce (figure 22). DMRT1 aurait pour fonction d'empêcher une initiation trop précoce des méioses. Une analyse des cibles de DMRT1 a montré qu'il pourrait inhiber *Stra8* et activer *Sohl1* (Murphy et al., 2010).

### **Les œstrogènes**

Les œstrogènes vont avoir un rôle important dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et de la spermatogenèse (review Chimento et al., 2014). Son action est médiée via 3 récepteurs appelés ESR1, ESR2 et GPER (figure 24). ESR1 et ESR2 sont retrouvés dans les différentes cellules du testicule, avec un patron qui peut varier en fonction des différentes espèces (Review Carreau and Hess, 2010). GPER, quant à lui, a été mis en évidence sur des cultures de cellules germinales. Le rôle important des œstrogènes sur la prolifération spermatogoniale a dans un premier temps été mis en évidence chez le lézard et la grenouille (Chieffi et al., 2000, 2002), via l'action sur la voie de signalisation ERK. Ce qui a ensuite été confirmé chez la souris, sur des culture de cellules GC-1, où l'on a une activation de ERK et de la cycline D1 via les récepteurs GPER et ESR1 (Sirianni et al., 2008). Une étude récente (Dumasia et al., 2016) a essayé de bien analyser le rôle de l'estradiol en fonction des différents récepteurs chez le rat. Ainsi on retrouve pour ESR2 un rôle dans la spermiation (via la régulation de *Arcp1b*) et dans l'apoptose des cellules germinales (via la répression de gènes anti-apoptotiques comme *Bcl2* (B-Cell CLL/Lymphoma 2) et *Bclw* (Tripathi et al., 2009)). ESR1 serait plus impliqué dans la régulation de la spermiogénèse en régulant l'expression de nucléoprotéines TNP1 (Transition Protein 1), TNP2 et PRM1 (Protamine 1). Chez la souris, des tests *in vitro* montrent qu'ESR1 semblerait impliqué dans l'initiation de mécanisme apoptotique en phosphorylant les Map kinases (Chimento et al., 2012).

Le rôle des oestrogènes sur la régulation de la spermatogenèse semble donc primordial mais aussi extrêmement complexe de par la grande hétérogénéité d'expression des récepteurs et leurs rôles qui semblent varier en fonction des différentes espèces.

## **BMP4**

L'utilisation de BMP4 (Bone morphogenic protein 4) sur des cultures de SSC entraîne une différenciation des cellules. Cette différenciation est médiée par la voie de signalisation Smad et entraîne une baisse de l'expression de marqueurs de renouvellement comme PLZF, et une augmentation de l'expression de facteur de différenciation comme SOHL2 (Li et al., 2014).

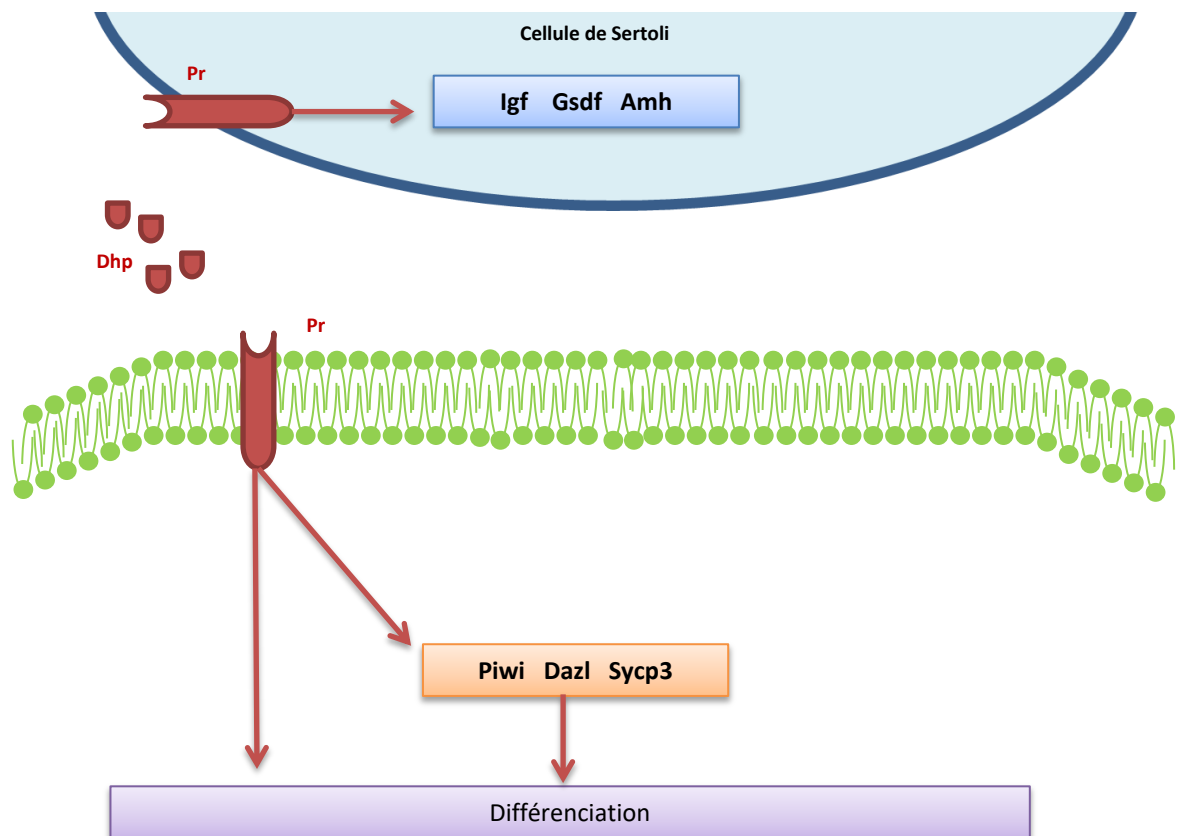
## **Les activines A et B**

L'activine est un dimère composé de deux sous-unités d'inhibine de type beta. Les gènes codants pour les sous-unités des inhibines beta sont essentiellement produits au niveau de la gonade par les cellules de Leydig (Lee et al., 1989). Des analyses réalisées chez le rat sur des co-cultures de cellules de Sertoli et de cellules germinales ont mis en évidence que les Activine A et B stimulaient la prolifération spermatogoniales (Mather et al., 1990; Nagano et al., 2003).

## **Facteurs intracellulaires**

Il existe encore un certain nombre de facteurs, qui ont un impact important sur la différenciation des SSC. On retrouve dans cette catégorie, des gènes comme *Ngn3*, *Sox3* et *Stat3*. NGN3 est un facteur de transcription de la famille bHLH. La transplantation de SSC dont l'expression de NGN3 est bloquée montre une incapacité de ces cellules à se différencier. On reste avec des spermatogonies indifférenciées (As, Ap, et Al). En culture, le nombre de cellules germinales total est identique avec ou sans traitement NGN3, suggérant qu'il n'agirait pas sur le processus de division spermatogoniales (Kaucher and Oatley, 2009). Enfin si l'on réalise un traçage cellulaire (via une méthode de pulse-chase) on remarque que la grande majorité des cellules NGN3+ seront entrées en différenciation (Nakagawa et al., 2007).

SOX3 est un membre de la famille des facteurs de transcription lié au Sry, dont la fonction principale est la détermination du devenir cellulaire (Kamachi and Kondoh, 2013) Il semble exclusivement exprimé dans les spermatogonies indifférenciées confortant l'idée que SOX3 promeut la différenciation spermatogonale de manière cellule autonome (Raverot et al., 2005). L'utilisation de souris KO conditionnelle pour *Sox3* a confirmé cette hypothèse, on a une perte des



**Figure 25 : Voies de régulation paracrine impliquées dans la différenciation des SSC chez les poissons:** Le principal régulateur endocrinien impliqué dans la différenciation des SSC chez les poissons est la DHP, qui peut se lier à ses récepteurs au niveau de la cellule de Sertoli (expression d'Igf/Gsdf/Amh) et des SSC (Expression de Piwi/Dazl/Sycp3).

cellules différenciées au profit des cellules indifférenciées (Laronda and Jameson, 2011). On ne sait pas encore réellement comment SOX3 entraîne cette différenciation, même s'il semble stimuler NGN3 et inhiber POU5F1 (Raverot et al., 2005).

STAT3 (Signal Transducers and Activator of Transcription 3) est retrouvé exprimé dans les gonocytes et les spermatogonies (Murphy et al., 2005). Le KO de *stat3* sur des cellules en culture montre une augmentation du nombre de SSC mais pas du nombre de cellules total, suggérant un arrêt de différenciation (Oatley et al., 2010). Si le fonctionnement précis de STAT3 n'est pas encore bien connu, il semblerait pouvoir se lier au promoteur distal de NGN3 et pourrait donc être impliqué dans sa régulation (Kaucher et al., 2012).

### **7.3. Chez les poissons**

Chez les poissons Téléostéens, en plus de son rôle connu dans la régulation de la spermiation et dans l'amélioration de la motilité des spermatozoïdes, les progestatifs comme la 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) (Scott et al., 2010) pourraient être impliqués dans l'initiation des étapes précoces de la méiose (figure 25). Il a été mis en évidence, chez l'anguille japonaise que la DHP entraîne la synthèse d'ADN et l'initiation de la méiose dans des cultures d'explants testiculaires (Miura et al., 2006) et qu'elle pourrait aussi être à l'origine de la production de 11KT (Ozaki et al., 2006). Ces informations ont été confirmées chez le poisson-zèbre, où l'utilisation du DHP entraîne la prolifération et la différenciation des cellules germinales. On a une abondance en spermatogonies B, et spermatocytes primaires. L'apport de DHP en plus de l'E2 entraînerait l'augmentation de gènes germinaux comme *piwi*, *dazl* et *sycp3*, mais aussi de gènes sertoliens comme les *igfs*, *gsdf* ou *amh* (Chen et al., 2013) ; une inhibition de l'action de la progestérone peut donc perturber la spermatogenèse (Liu et al., 2014). La DHP induit un changement dans l'expression de marqueurs de méiose comme la recombinaise *dmc1* et *spo11*, qui est lui impliqué dans les coupures double brin d'ADN (Keeney et al., 1997; Smith and Nicolas, 1998).

## **8. Le poisson zèbre, une espèce modèle**

Une espèce modèle est en général une espèce qui est largement utilisée par la communauté scientifique. Elle peut aussi être représentative d'un groupe d'espèces ou posséder des caractéristiques génétiques ou phénotypiques particulières.

Le poisson-zèbre qui était jusque-là une espèce très appréciée par les aquariophiles a commencé à devenir un modèle d'intérêt pour la communauté scientifique dès la fin des années 1960 sous l'impulsion d'un scientifique de l'université de l'Oregon aux Etats-Unis, George Streisinger. Ce chercheur cherchait un autre modèle de vertébrés plus facile à manipuler que la souris pour les études de génétique du développement précoce. C'est la maîtrise de la reproduction en aquarium et la transparence du chorion des œufs qui facilite l'observation du développement précoce ainsi que la facilité de générer des mutants (mutagenèse par exposition à des rayonnements d'abord radioactifs, puis chimiques) qui ont permis au poisson-zèbre d'être largement utilisé comme espèce modèle à travers le monde.

## **8.1. Présentation générale**

### **8.1.1. Classification taxonomique et intérêt pour l'aquaculture**

Le poisson-zèbre possède les caractères anatomiques spécifiques, des vertébrés avec des pièces squelettiques autour du système nerveux central, des Gnathostomes car il possède une mâchoire, des Actinoptérygiens avec un squelette osseux, et des poissons téléostéens de par sa peau recouverte d'écailles. Il fait partie de la famille des Cyprinidés. Les caractéristiques principales de cette famille sont, un corps recouvert de larges écailles, une tête nue et des nageoires pelviennes insérées au milieu de l'abdomen. La bouche est dépourvue de dents et les mâchoires supérieures, protractiles, peuvent porter une ou deux paires de barbillons plus ou moins développés. Cette famille des Cyprinidés comprend plus de 3000 espèces et représente de loin, la grande majorité de la production piscicole continentale avec plus de 24 millions de tonnes produites contre seulement 3 millions de tonnes pour les salmonidés. Les principales espèces d'élevage sont les carpes dites chinoises (argentées, noires, herbivores, communes, ou marbrées), les carpes dites indiennes (Catla, Rohu...), et les brèmes chinoises. Ainsi, le poisson-zèbre est



un poisson modèle de choix pour comprendre la biologie des cyprinidés d'intérêt pour l'aquaculture.

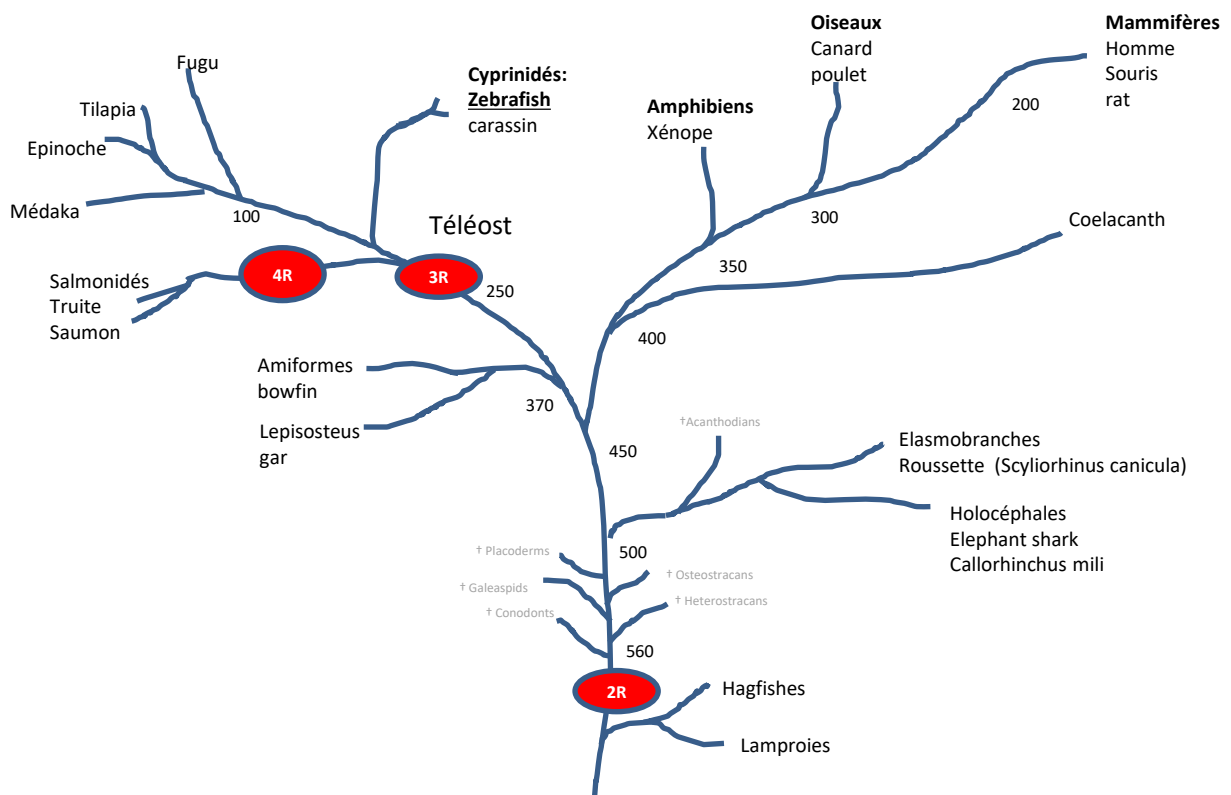
### **8.1.2. Caractéristiques et lieu de vie naturel.**

Des recherches menées en 2007 ont essayé de mieux caractériser les lieux de vie du poisson-zèbre (Engeszer et al., 2007). Le poisson-zèbre est retrouvé dans son milieu naturel principalement en Inde, Malaisie, Pakistan, et le Népal dans de l'eau douce et calme comme les rizières ou dans de l'eau stagnante. A l'âge adulte, il mesure entre 4 et 5 cm. Le mâle va être élancé et la femelle plus arrondie avec 5 bandes bleues leur donnant cet aspect zébré.

#### **8.1.2.1. Conditions d'élevage et lignées sauvages disponibles en laboratoire**

Le poisson-zèbre étant une espèce non endémique, elle est élevée dans des élevages à circuit fermé. Cela permet de protéger les individus face à d'éventuelles maladies (processus de quarantaine) et d'éviter la contamination de l'environnement par cette espèce allochtone ou par des individus génétiquement modifiés. Bien que le poisson-zèbre vive dans des eaux allant de 4 à 40°C, il est élevé dans une eau à 27°C osmosée pour maintenir un sexe ratio équilibré et selon un cycle de 16h de jour et 8h de nuit pour maintenir une reproduction régulière. Un centre de ressources est voué au maintien des souches de poisson-zèbre d'intérêt, à la diffusion d'anticorps et à la diffusion des connaissances sur ce modèle. Ce centre de ressources, appelé Poisson-zèbre International Resource Center (ZIRC) [https://poisson-zèbre.org/.](https://poisson-zèbre.org/), rassemble plus de 25000 souches de poisson-zèbre mutants référencées ainsi que 6 souches sauvages.

La souche AB : Cette souche dérive de deux lignées A et B qui ont été commandées séparément par George Streisinger dans un magasin d'animaux en Albany (Oregon, USA). Ces souches A et B originelles provenaient sûrement d'une écloserie de Floride. Les femelles AB qui donnaient de beaux embryons en bonne santé étaient récupérées et croisées avec des mâles non sélectionnés. La lignée AB a été constamment maintenue de cette manière entre 1978 et 1990.



**Figure 26 : Arbre phylogénétique des vertébrés.** Classement des différentes espèces de vertébrés et distance évolutive par rapport à la lamproie (560 millions d'années) et localisation des différentes duplications du génome (2R, 3R, 4R).

La souche Tübingen (TU) : Cette souche tient son nom de la ville en Allemagne d'où proviennent les poisson-zèbre. Les poissons ont des nageoires assez courtes, et c'est cette souche qui a été utilisée par Sanger pour réaliser le séquençage du génome du poisson zèbre. Elle est aussi beaucoup utilisée en mutagenèse.

La souche AB/TU : Cette lignée comme son nom l'indique provient d'un croisement entre des individus de la lignée AB et des individus de la lignée TU réalisé par Nancy Hopkins et Adam Amsterdam.

La souche SAT ou Sanger AB Tubingen est dérivée de deux lignées AB et TU. Un mâle double haploïde AB et une femelle double haploïde TU ont été croisés par Amanda Rapp et Catherine Wilson dans le laboratoire de John Postlethwait pour créer cette lignée.

La souche Wilk est une lignée polymorphique de la lignée TU et a été décrite pour la première fois par Gerd-Jorg Rauch, Michael Granato, Pascal Haffter. (Rauch et al., 1997)

La souche TL, pour Tupfel long fin, est une lignée homozygote pour leot1 et lofdt2. leot1 est une mutation récessive causant des taches chez les poissons adultes, également connu sous le nom TUP. lofdt2 est une mutation viable à l'état homozygote et dominante à l'origine des longues nageoires.

#### **8.1.2.2. Caractéristiques du génome**

Le génome (1,5 milliards de bases) est d'une taille inférieure au génome humain (3,5 milliards de bases) mais bien plus grand que celui du fugu (0,4 milliards de bases). Le nombre de gènes annotés à partir de l'assemblage GRCz10 est de 30095 mais un total de 36087 gènes est prédit. Les informations concernant ces gènes sont accessibles sur différentes bases de données publiques et parfois spécifiquement dédiée au poisson-zèbre (<http://zfin.org/>). Comme les autres poissons téléostéens, l'histoire évolutive du génome de poisson-zèbre est caractérisée par 3 événements de duplication complète du génome (3R) par rapport au génome ancestral des urochordés soit une de plus que chez les mammifères (figure 26). La duplication 3R intervenue chez les poissons téléostéens a été suivie de la rétention de nombreuses copies mais le nombre total de gènes restent bien inférieur chez le poisson-zèbre par rapport aux salmonidés (truite et saumon) ou à

d'autres cyprinidés proches comme le poisson rouge car ces espèces ont subi un 4<sup>ème</sup> évènement de duplication totale du génome souvent appelée 4R.

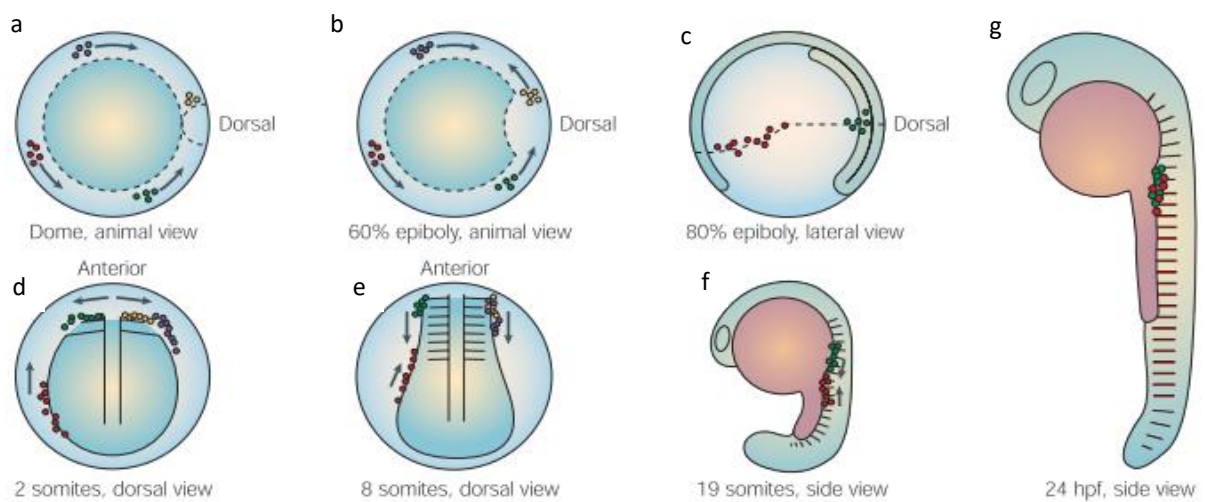
## **8.2. Différenciation sexuelle et cinétique d'initiation de la gamétogénèse**

### **8.2.1. Gonadogenèse**

L'observation de l'ontogenèse gonadique chez le poisson-zèbre peut se faire dès les premières heures du développement. En effet depuis la découverte de l'homologue du gène vasa de la drosophile chez le poisson-zèbre, il est possible de suivre la migration des PGC vers les crêtes génitales (Olsen et al., 1997; Yoon et al., 1997). Environ 4.5h après la fécondation (blastula tardive) on voit apparaître 4 clusters d'environ 4 cellules germinales appelées PGC (figure 27). Vers 6.5h (60% épibolie) ces clusters vont commencer à se déplacer afin de rejoindre une région plus dorsale. Ce mouvement est commun avec les cellules somatiques et peut s'expliquer par la compaction précoce avant la gastrulation. A cette étape on remarque deux catégories de clusters, ceux arrivés au niveau dorsal et ceux qui sont encore au niveau ventral. Les clusters dorsaux vont s'éloigner de la ligne dorsale pour commencer à s'aligner le long du mésoderme para-axial, entre la tête et le tronc du futur poisson. Les PGC qui étaient en position ventrale vont elles aussi se déplacer sur les bords latéraux de l'embryon (figure 27). Environ 10h après la fécondation (stade 2 somites), la majorité des PGC est arrivée au niveau des premiers somites où ils seront rejoints par les PGC venant de la zone ventrale. A 13h post-fécondation (stade 8 somites) toutes les PGC sont présentes sur les bords latéraux du mésoderme para-axial, ils s'étendent entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> somite. Ils vont alors commencer à rejoindre une zone un peu plus postérieure, pour atteindre à 24h la région latérale des somites 8 et 10 où ils formeront, avec les cellules somatiques mésenchymateuses, la gonade primordiale (Gamo, 1961; Hamaguchi, 1982; Raz, 2003).

### **8.2.2. Hermaphroditisme juvénile**

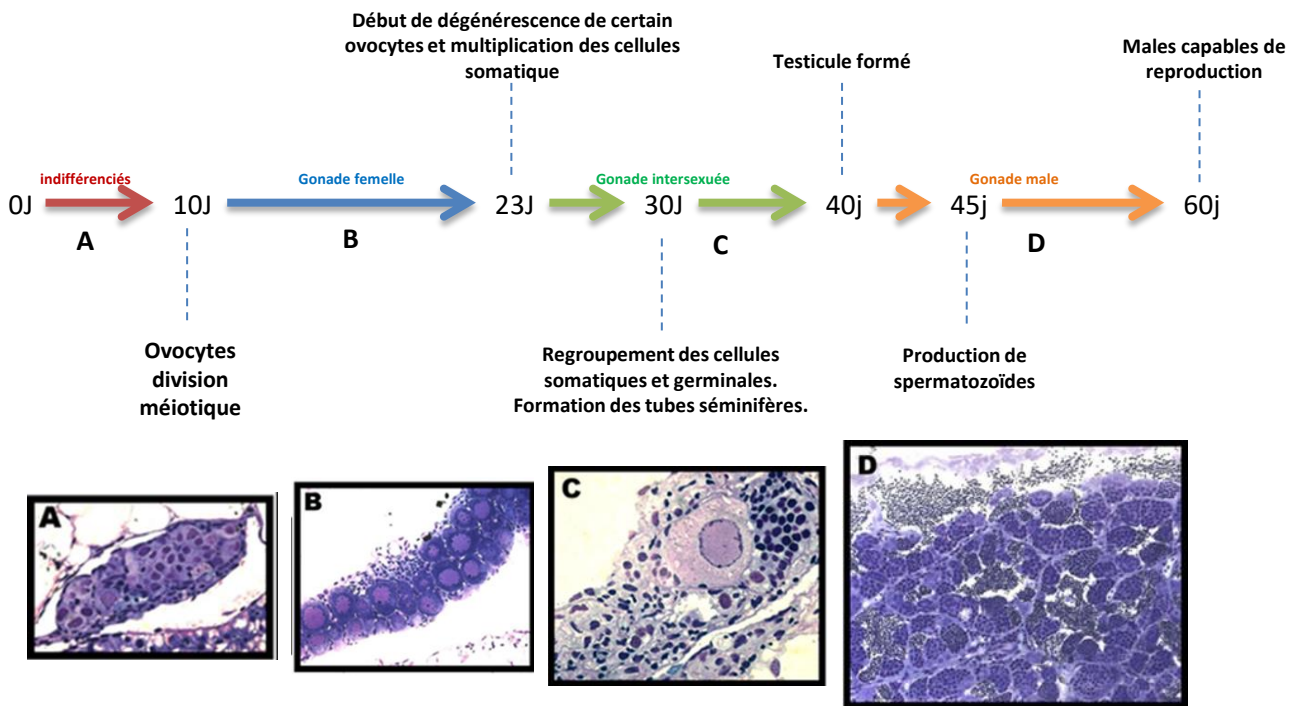
Les premiers signes de différenciation gonadique, apparaissent au bout de 10 jours, quand les premiers cystes de cellules germinales se forment avec des



**Figure 27 : Gonadogenèse chez le poisson-zèbre.** Les 4 clusters de cellules formés 4,5h après la fécondation vont migrer progressivement dans l'embryon. Ils vont dans un premier temps se diriger vers la région dorsale de l'embryon (a,b,c) avant de se répartir sur des zones plus latérales (d,e) avant de finir leur migration au niveau des somites 8 et 10 ou se développera la future gonade (f,g). (Raz 2003)

gonocytes en division mitotique ou des ovocytes en prophase de division méiotique, suggérant une initiation de l'ovogenèse (Takahashi, 1977). Dès l'âge de 14 jours, tous les poissons juvéniles présentent des gonades engagées dans une différenciation ovarienne femelle avec la présence de lamelles ovigères et la présence d'ovocytes dans la phase initiale de croissance (auxocytes). On parle alors d'hermaphrodisme juvénile (figure 28). Entre 14 et 20 jours, l'extrémité distale de l'ovaire fusionne avec la paroi des cellules coelomiques et les auxocytes continuent de croître. A partir de 23 jours, il apparaît une certaine disparité au niveau du développement de l'ovaire qui est caractérisée par l'apparition d'ovocytes atrétiques (Takahashi, 1977). Cette dégénérescence est asynchrone et sporadique selon les régions de la gonade. Dans le même temps, les cellules somatiques du stroma vont augmenter en nombre, d'abord à la périphérie de la gonade, puis autour des cellules germinales pré-méiotiques résiduelles, qui seront alors séparées les unes des autres. Vers l'âge de 30 jours, ces groupes de cellules germinales et somatiques se sont bien développés et ils se regroupent en clusters pour former *in fine* les tubes séminifères avec un espace vide au centre (Takahashi, 1977). La morphogénèse testiculaire devient de plus en plus évidente entre 30 et 40 jours. Les animaux engagés dans cette transformation gonadique restent donc intersexués jusqu'à l'âge de 40 jours (figure 28). La production de spermatozoïdes matures apparaît dès 45 jours mais les animaux, n'atteignent leur capacité à se reproduire qu'après 60 jours (figure 28). Un sexe ratio équilibré est en général observé dans les conditions standards d'élevage à 26 - 27°C.

Les mécanismes impliqués dans la différenciation sexuelle chez le poisson-zèbre restent mal connus et semblent multiples. Le mécanisme d'apoptose des cellules ovocytaires semble essentiel, en effet sa perturbation qu'elle soit génétique (via l'inhibition de l'aromatase ou de l'estrogène) (Fenske and Segner, 2004; Uchida et al., 2004) ou environnementale (utilisation de 17 $\alpha$ -éthynylestradiol et de fadrozole) (Luzio et al., 2016) entraîne une perturbation de la différenciation sexuelle. La régulation de cette apoptose fait intervenir de nombreux acteurs et sous-entendrait que la détermination du sexe chez le poisson-zèbre serait bien génétique et pas seulement environnementale (Liew and Orbán, 2014). Le nombre de PGC présentes au niveau des gonades au moment de la différenciation sexuelle semble aussi important. En effet, une étude met en évidence qu'une perte précoce des PGC



**Figure 28 : Hermaphroditisme juvénile chez le poisson-zèbre.** Les 10 premiers jours de développement après fécondation, les cellules germinales sont encore indifférenciées (A). À partir du 10e jour, on commence à voir apparaître des ovocytes qui initieraient des divisions méiotiques (B). Au 23e jour un certain nombre de ces ovocytes va entrer en atresie et disparaître, en parallèle certaines cellules somatiques se multiplient (C). Au bout de 30 jours, ces cellules somatiques vont se rapprocher des cellules germinales, et vont former les tubes séminifères qui aboutiront à un testicule au bout de 40j. Ensuite il faut attendre encore un peu avant de voir apparaître les premiers spermatozoïdes. L'individu ne sera réellement mature qu'au bout de 60jours (D).

(Adapté de <http://www.eb.tuebingen.mpg.de/de/forschung/abteilungen/genetik/alumni/kelle-siegfried-sex-determination.html>)

favoriserait le développement des testicules (Tzung et al., 2015). On notera aussi le rôle des prostaglandines dans la transition vers le testicule (Pradhan and Olsson, 2014).

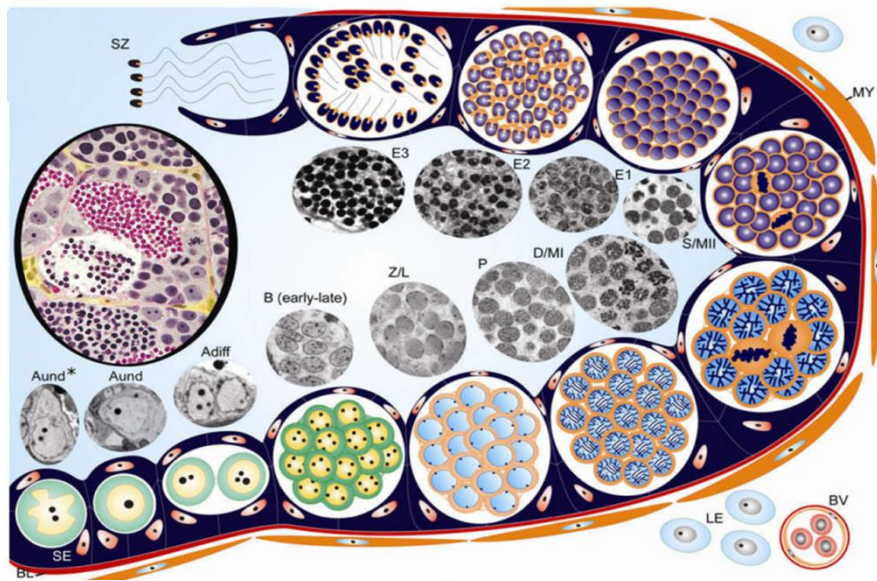
### **8.3. Régulation des cycles de reproduction**

#### **8.3.1. Photopériode, nutrition, densité**

Chez les poisson-zèbre, la reproduction externe est dépendante de la lumière car elle n'intervient qu'environ 30 minutes après le déclenchement de la lumière. Elle est favorisée par le dépôt d'un support de ponte (souvent un bac de bille) au fond de l'aquarium. La reproduction débute par une parade nuptiale du male autour de la femelle qui libère alors les œufs en quelques minutes. Les œufs tombent par sédimentation au fond de l'aquarium et la présence d'un double fond rainuré ou de billes est recommandée pour les protéger du cannibalisme. En sachant qu'une femelle poisson-zèbre va pondre de manière relativement irrégulière tous les quatre à sept jours (Hisaka and Firlit, 1962), la constitution d'aquarium avec différentes femelles permet d'avoir des pontes quasi quotidiennes (Niimi and LaHam, 1974). Une ponte moyenne correspond à environ 200 œufs (Legault, 1958). Les œufs vont éclore environ 2 ou 3 jours après la fécondation.

Il existe de nombreux facteurs zootechniques qui peuvent être impliqués dans la qualité de la reproduction. Chez le poisson-zèbre, les premières pontes peuvent survenir chez des individus d'environ deux mois et demi, cependant ses premières pontes sont souvent mauvaises tant en qualité qu'en quantité. De même les animaux trop âgés (>1an et demi) ont tendance à montrer des dysfonctionnements. Des dégénérescences testiculaires sont fréquemment observées chez les mâles âgés de plus de 1 an et demi. Les femelles âgées montrent un blocage de ponte. Il n'y a pas que l'âge qui peut impacter une bonne reproduction chez le poisson-zèbre, une bonne alimentation est aussi essentielle. Des recherches ont mis en évidence qu'une alimentation à base d'aliments riches, comme les Artémias, permettait des pontes plus abondantes que lors d'une alimentation plus pauvre en calories (Markovich et al., 2007). La composition en acide gras polyinsaturés a elle aussi un impact (Meinelt et al., 1999). La qualité des différents produits commerciaux est aussi à prendre en compte car elle peut aussi impacter la croissance et la survie des poissons (Siccardi





**Figure 29 : Structure du testicule et cycle spermatogénétique chez le poisson-zèbre male adulte.**

Testicules de type non restreint. Les tubules séminifères sont délimité par une lame basale (BL) et une couche de cellules périvitubulaires myoïdes (MY). Au seins de ce tubule les cellules germinales sont entourées par les cellules de Sertoli (SE). A l'intérieur des cystes ont retrouve les spermatogonies Aund\* (spermatogonies A indifférenciées \*) ; Aund (spermatogonie A indifférenciées) ; A diff (spermatogonies A différenciées) ; B (spermatogonies B) ; Z/L (spermatocytes au stade zygotène /leptotène ; P (spermatocytes au stade pachytène) , D/MI (spermatocytes au stade diplotène/metaphase 1) ; S/MII (spermatocytes secondaire et métaphase 2) ; E1 (spermatides précoce) ; E2 (spermatides intermédiaire) ; E3 (spermatides finaux) ; SZ (spermatozoïdes). (Schulz et al 2010)

et al., 2009). Enfin, l'un des derniers facteurs d'importance à surveiller dans les élevages est la densité à laquelle les poissons sont élevés. Si la densité n'impacte pas directement la qualité de la reproduction (Castranova et al., 2011), elle va impacter leur santé et leur bien-être (Ellis et al., 2002). Les poissons élevés à de fortes densités vont avoir des fonctions immunitaires amoindries (Suomalainen et al., 2005; Wedemeyer, 1996) et un taux de croissance plus faible (Procarione et al., 1999). Cela peut être dû au stress car le niveau de cortisol augmente dans ces conditions (Matthews, 2004; Ramsay et al., 2009; Vijayan and Leatherland, 1990). Si avoir de bonnes conditions pour le bien-être et une bonne reproduction des poissons est essentiel, la modification de certains de ces facteurs peut aussi avoir un intérêt pour créer des conditions favorables à l'étude de certains mécanismes physiologiques. Par exemple chez le tilapia une température trop basse peut bloquer les cellules méiotiques au stade pachytène, ou à l'inverse une augmentation entraîne une accélération du processus et une forte production de spermatozoïdes. (Alvarenga and França, 2009; Vilela et al 2003.). Chez le poisson-zèbre une incubation des poissons à 35°C permet de bloquer la spermiogenèse et l'ajout de busulfan réduit les proliférations goniales ce qui permet de générer des conditions favorables à l'étude des étapes précoces de la spermatogenèse (Nóbrega et al., 2010a). Il a été montré que l'augmentation de la densité d'élevage chez le poisson-zèbre engendre un sexe ratio légèrement modifié en faveur des males (Liew et al., 2012) ce qui peut être un avantage lors de l'étude de la spermatogenèse.

#### **8.4. Structure du testicule et cycle spermatogénétique chez l'adulte sexuellement mature**

La structure des testicules de poisson-zèbre adulte est de type non restreint. Les tubules séminifères sont délimités par la tunica propria et ils renferment tous les types cellulaires de la spermatogenèse entourés par leurs cellules de Sertoli. Les différentes cellules germinales ont été bien décrites chez le poisson-zèbre d'un point de vue morphologique (Leal et al., 2009a; Schulz et al., 2010a).

D'après cette étude détaillée, deux types de spermatogonies A indifférenciées, la spermatogonie A indif\* et la A indif seraient à l'origine de la lignée germinale (figure 29). Toutes les deux sont des cellules de grande taille (15µm) avec un large noyau (8.6µm) comportant une chromatine peu condensée, et un ou deux nucléoles.

Cependant les Aindif\* vont avoir une enveloppe nucléaire très irrégulière, et un rapport nucléo-cytoplasmique plus élevé que les spermatogonies A indif. Ces spermatogonies indifférenciées vont ensuite donner les spermatogonies A différenciées qui sont morphologiquement proche des cellules précédentes. Elles sont légèrement plus petites, avec un noyau un peu plus dense et petit laissant apparaitre quelques points d'hétérochromatine, une enveloppe nucléaire régulière arrondie, et 2 ou 3 petits nucléoles. Ces cellules regroupent les cystes de 2, 4 et 8 cellules, qui sont toutes interconnectées par un pont intra-cytoplasmique, généré par une cytokinèse incomplète. On notera aussi parfois la présence de cystes de 2 ou 3 cellules comportant une cellule indifférenciée. Les cystes de spermatogonies A de 8 cellules donneront, après division, le premier cyste de cellules spermatogoniales de type B appelées spermatogonies B précoces (figure 29). Elles vont avoir un noyau rond et allongé avec un ou deux nucléoles, et une quantité d'hétérochromatine plus importante que dans les spermatogonies A. Ces spermatogonies B précoces sont regroupées dans les cystes de 16, 32 et 64 cellules. On arrive ensuite aux spermatogonies B tardives, le noyau est un peu plus petit que pour les cellules précédentes, et avec encore plus d'hétérochromatine qui forme des taches intenses liées à la membrane nucléaire. Ces spermatogonies sont présentes dans les cystes de 128 et 256 cellules. Les spermatogonies B tardives vont alors subir une dernière division mitotique qui conduira à la production d'un cyste de 512 spermatocytes primaires au stade leptotène de la prophase. Ces spermatocytes vont poursuivre leur division méiotique, et seront donc classés en fonction des caractéristiques morphologiques observées durant les différentes étapes de la prophase. Les spermatocytes au stade leptotène et zygotène ont un large noyau rond, avec une chromatine claire présentant des petites zones d'hétérochromatine proche de l'enveloppe nucléaire. Au stade pachytène, les cellules sont un peu plus larges, leur noyau est plus dense et commence à laisser apparaitre des chromosomes condensés au centre du noyau. Au stade diplotène les spermatocytes présentent des figures métaphasiques, avec des chromosomes alignés au centre du noyau. On est en métaphase de première division méiotique (figure 29). Lors de l'anaphase et de la télophase les chromosomes homologues vont être séparés. et on va avoir formation de 1024 spermatocytes secondaires. Ces spermatocytes secondaires sont plus rares à observer à l'exception de ceux en métaphase. Cette deuxième division de la méiose est équationnelle et elle aboutit à l'apparition de 2048 spermatides. Les

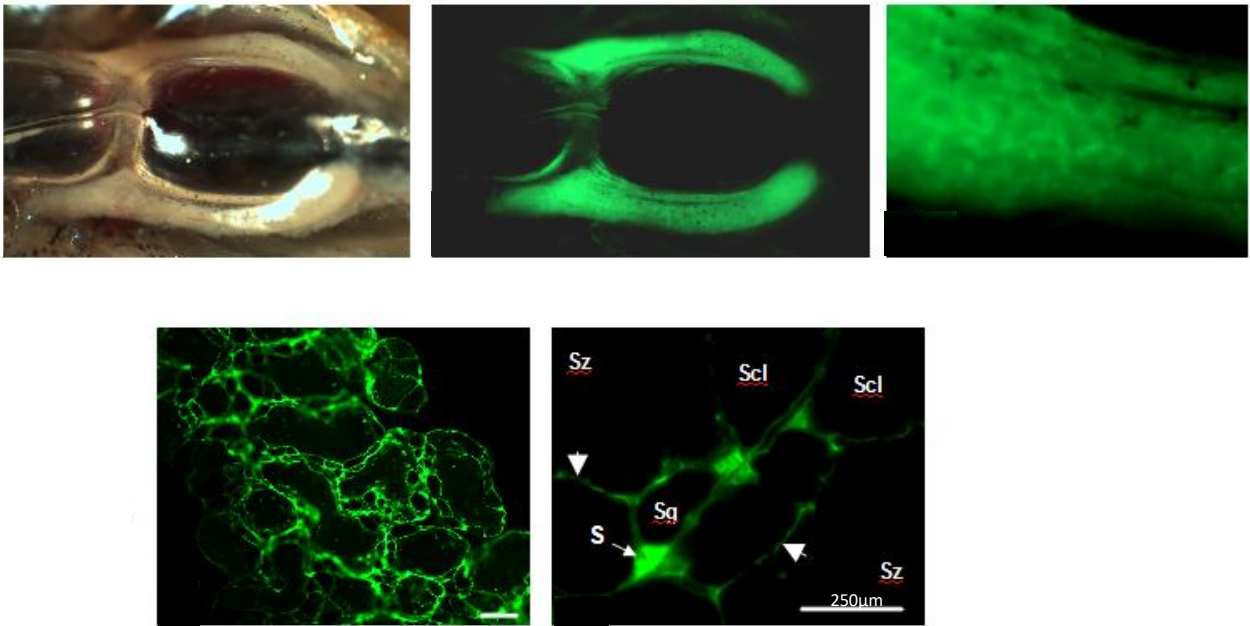
spermatides sont classées en 3 catégories, sur la base du degré de compaction du noyau, la perte du pont cytoplasmique et l'apparition du flagelle (figure 29). Ces 3 catégories correspondent aux spermatides précoces, intermédiaires et finales qui donneront les spermatozoïdes que l'on retrouve dans la lumière des tubes séminifères. Le temps total nécessaire à la réalisation de la spermatogenèse chez le poisson-zèbre serait de 6 jours (Leal et al., 2009a; Schulz et al., 2010a).

### **8.5. Obtention de lignées transgéniques de poisson-zèbre bien adaptées à l'étude de la niche germinale**

Comme décrit précédemment, la niche germinale chez le poisson-zèbre est principalement composée des cellules de Sertoli et des cellules souches spermatogoniales. Grâce à la maîtrise des techniques de transgénèse additive, plusieurs lignées transgéniques exprimant la GFP dans ces cellules ont pu être générées pour en étudier les caractéristiques.

#### **8.5.1. Lignée transgénique adaptée à l'étude de la cellule de Sertoli**

Des travaux réalisés au laboratoire ont permis de caractériser chez le poisson-zèbre l'expression du gène *gsdf* qui est présent en copie unique sur le génome de cette espèce. Le profil d'expression cellule-spécifique est bien conservé chez les poissons téléostéens. L'expression de *gsdf* est restreinte aux cellules de la granulosa chez la femelle et aux cellules de Sertoli chez le mâle. (Gautier et al., 2011b). Un transgène composé d'un fragment de 2kb du promoteur proximal du gène *gsdf*, placé en amont du cadre de lecture ouvert de la GFP, a été injecté chez des embryons de poisson-zèbre pour générer deux lignées transgéniques. L'observation des poissons descendants de ces lignées a montré l'apparition d'une fluorescence spécifique de la GFP au niveau des gonades dès 16 jours après la fécondation, c'est-à-dire peu après l'initiation de l'ovogénèse mais avant celle de la spermatogenèse chez cette espèce. Cette expression du transgène (figure 30) est restreinte aux cellules de Sertoli et de la granulosa chez l'adulte (Gautier et al., 2011a). Le profil d'expression du transgène s'est révélé stable sur plus de 6 générations. Le transgène est transmis à la descendance avec une ségrégation mendélienne. A notre connaissance, il s'agit



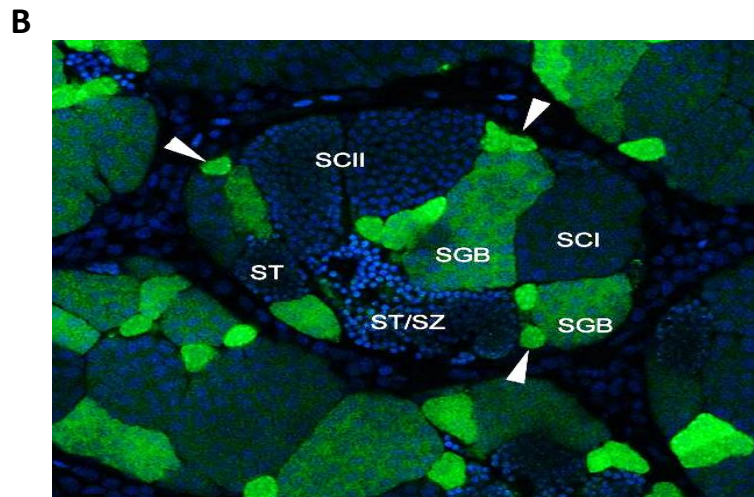
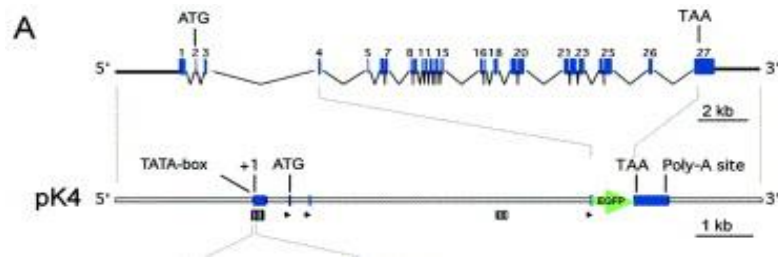
**Figure 30. Patron d'expression du transgène Gsdf::eGFP.** On retrouve une expression du transgène spécifique à la gonade de l'individu (A, B , C) avec un patron d'expression qui semble entourer des groupes de cellules (D). Les cellules de Sertoli sont très fortement marquées, elles forment bien les cystes entourant les cellules germinales. S : Cellule de Sertoli, Sg: spermatogonie; Scl spermatocyte primaire, Sz : spermatozoïdes. Barre d'échelle : 250µm (Gautier et al 2011)

toujours à ce jour de la seule lignée publiée exprimant la GFP spécifiquement dans les cellules de Sertoli.

### **8.5.2. Lignées transgéniques adaptées à l'étude des cellules germinales.**

A ce jour, il n'existe pas de lignées de poisson-zèbre transgéniques exprimant la GFP spécifiquement dans les cellules souches spermatogoniales. La première lignée présentant une fluorescence de type GFP dans les cellules souches germinales a été décrite par Krøvel et Olsen en 2002. Il s'agit de la lignée *vas::eGFP*. Le transgène était composé, en amont, d'un fragment promoteur de 8,5Kb comprenant les 4 premiers exons du gène *vasa* fusionné avec le cadre de lecture ouvert de la GFP. Ce transgène était également composé au niveau de sa partie 3', d'un fragment génomique de 2,3kb contenant le 3'UTR du gène *vasa*. Cette région 3'UTR est connue pour stabiliser les transcrits *vasa* dans la lignée germinale. La production de la lignée *vas::eGFP* a permis de suivre la migration des PGC chez le poisson-zèbre au cours du développement précoce (Krøvel and Olsen, 2002), et d'engager les premières études de la niche germinale chez l'adulte (Nóbrega et al., 2010a). Chez le mâle adulte la fluorescence émise par la GFP est intense dans les spermatogonies A indif\* (figure 31) puis elle baisse progressivement jusqu'aux spermatozoïdes (Nóbrega et al., 2010a). Malgré l'expression variable de la GFP dans les différentes populations de spermatogonies, il a été démontré que la fraction cellulaire montrant l'intensité de fluorescence la plus élevée contenait bien des cellules souches spermatogoniales.

Une autre lignée transgénique, nommée *Dr\_vasa:eGFPtol2*, a été générée au laboratoire avec une construction différente de celle utilisée précédemment (Krøvel and Olsen, 2002). Premièrement, cette nouvelle construction contient toujours un fragment promoteur du gène *vasa* fusionné en amont du cadre ouvert de lecture de la GFP. Cependant ce fragment promoteur est beaucoup plus petit en taille (1.4 kb au lieu de 1.9 kb) et il ne contient que le premier exon. De plus, la construction ne comportait pas la région 3'UTR du gène *vasa* qui a été remplacé par une région portant le signal de polyadénylation de l'ARN codant pour l'antigène T du virus SV40. Les premières analyses réalisées dans le cadre de la thèse d'Aude Gautier à partir d'une première lignée ont permis de mettre en évidence par qPCR une expression spécifique du transgène dans les gonades mâles et femelles. Chez le mâle adulte,

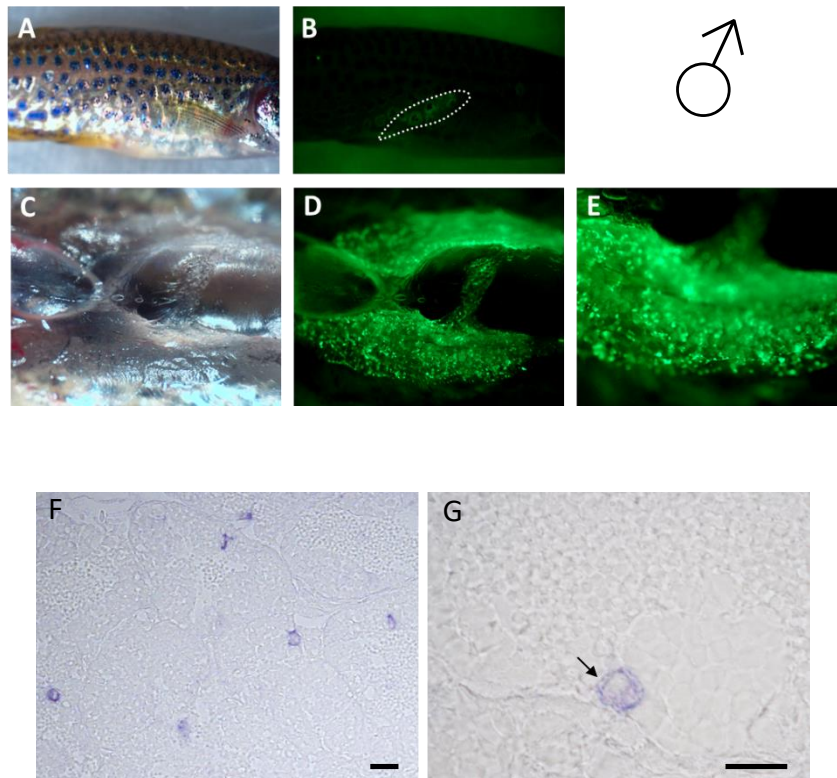


**Figure 31. Construction et patron d'expression du transgène vas:eGFP.** **A** Transgène composé d'un fragment de 8,5Kb comprenant les 4 premiers exons du gène vasa, fusionnés avec le cadre ouvert de lecture de la GFP et d'un de 2,3kb contenant le 3'UTR. **B** Patron d'expression du transgène vas:eGFP visualisé sur coupe de testicules de zebrafish adulte. La GFP est trouvée fortement dans les spermatogonies A indif (Fleche) puis elle baisse progressivement dans les spermatogonies B (SGB), spermatocytes primaires (SCI), spermatocytes secondaires (SCII), spermatides (ST) et spermatozoïdes (SZ). Adapté de Nóbrega et al., 2010 et Krovel and Olsen 2002.

une hybridation *in toto* des ARN tissulaires avait permis de montrer que l'expression du transcrit GFP était restreinte à des cellules isolées de grande taille et accolées à la lame basale des tubes séminifères (figure 32). Ce profil d'expression apparemment plus restreint que celui de la lignée *vas::eGFP* semblait compatible avec une expression possible de la GFP dans les cellules spermatogoniales souches.

En résumé, les deux lignées (*Dr\_vasa:eGFPtol2* et *gsdf:eGFPtol2*) constituaient des modèles de choix i) pour étudier les caractéristiques moléculaires des deux types cellulaires majeurs retrouvés au sein de la niche germinale et ii) pour identifier des voies de régulation paracrine potentiellement impliquées dans la régulation du devenir des cellules souches spermatogoniales.





**Figure 32. Patron d'expression du transgène *vasa::eGFPtol2*.** On retrouve une expression du transgène spécifique à la gonade de l'individu (A, B , C, D) avec un patron d'expression qui montre des spots intenses de fluorescences(D,E). L'analyse par Hybridation in toto montre l'expression du transgène ciblant des cellules larges, isolées proches de la membrane basale du tube séminifère (F, G). Barre d'échelle : 20µm

# **Projet de thèse**

---

Mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement impliqués dans la régulation du stock de cellules souches spermatogoniales chez le poisson zèbre *Danio rerio*

## **Contexte et enjeux liés au projet de thèse :**

### **Nécessité de développer de nouvelles pratiques d'élevage qui permettent de maîtriser la puberté**

La compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation de la maturation sexuelle et la fertilité des poissons est un enjeu important pour la compétitivité et la durabilité de la filière aquacole. Pour le secteur des écloséries, la maîtrise de la maturation sexuelle et de la fertilité des poissons maintenus en captivité permet l'obtention des gamètes nécessaires à la production des alevins, mais aussi, à la mise en place des programmes de sélection de lignées mieux adaptées aux contraintes et/ou à l'évolution des conditions d'élevage (domestication, résistance aux maladies, formulation des aliments, contraintes thermiques). Néanmoins, la maturation sexuelle peut avoir des conséquences négatives pour le secteur des piscicultures de grossissement. La maturation sexuelle diminue les performances de croissance des animaux et la qualité de la chair chez certaines espèces comme les salmonidés. Ces effets négatifs sont d'autant plus préjudiciables que l'amélioration des conditions d'élevage des poissons conduit à une maturité sexuelle plus précoce qui ne permet plus de produire des poissons ayant la taille et/ou la qualité nécessaire à leur commercialisation (Bye and Lincoln, 1986). Par exemple, cette maturation sexuelle précoce peut intervenir à un (« Grilse ») ou deux ans (« Parr ») chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*), alors que la taille commerciale est atteinte juste avant le cycle de reproduction naturelle à trois ans (Aksnes et al., 1986). En plus d'impacter le taux de croissance, la maturation sexuelle peut aussi avoir des effets négatifs sur la santé et donc le « bien-être » des poissons puisqu'elle va aussi augmenter la susceptibilité des animaux aux maladies (St-Hilaire et al., 1998). Le contrôle des cycles de reproduction ou de la maturité sexuelle par la photopériode est devenu une pratique courante en aquaculture, mais son efficacité demeure très variable et imprévisible même sous des latitudes élevées comme pour les fjords norvégiens.

La maturation sexuelle des poissons d'élevage en grossissement présente des inconvénients qui dépassent le domaine de l'agronomie. En effet, elle constitue un enjeu écologique important pour l'acceptabilité sociétale et la durabilité de la filière. Les productions en système ouvert (cage en mer) ne peuvent éviter

l'échappement de millions d'animaux (trous dans les filets, tempêtes, problème technique de manipulation...) provenant de souches sélectionnées ou d'espèces allochtones pouvant devenir invasives. Ces échappés entrent en compétition alimentaire avec les espèces vivant à proximité des élevages et ils peuvent contribuer à la propagation de maladies. Les animaux échappés peuvent aussi se reproduire avec les souches naturelles et engendrer des introgressions géniques dont les conséquences sur la baisse des populations naturelles sont encore difficiles à évaluer tant ce paramètre est multifactoriel. Ainsi, la stérilisation des poissons d'élevage est un objectif préconisé par une directive européenne pour maintenir la biodiversité des espèces aquatiques, mais aussi terrestres. La triploïdisation est une pratique d'élevage qui permet de stériliser les femelles, mais elle présente, selon les espèces, des inconvénients majeurs (difformités, cataractes, mortalités accrues) qui remettent en question son acceptabilité sur le plan du Bien-Etre des animaux et sa rentabilité économique dans les systèmes ouverts de production intensive.

### **Besoins de développer des biotechnologies basées sur la manipulation des cellules germinales souches**

L'augmentation importante du progrès génétique obtenu par les filières, l'augmentation du nombre de souches d'intérêts attendues dans les années à venir avec l'essor des techniques d'édition du génome et le risque de disparition de certaines espèces ou populations de poissons sauvages mettent bien en avant la nécessité de trouver un moyen de préserver ces ressources génétiques, mais aussi d'être capable de les régénérer. En ce qui concerne le domaine végétal, de nombreuses espèces et variétés de plantes ont déjà été conservées (Börner, 2006) avec la mise en place par le gouvernement norvégien de la réserve mondiale de semences du Svalbard qui conserve des graines de nombreuses cultures vivrières permettant ainsi de préserver la diversité génétique. En ce qui concerne les espèces animales terrestres, la préservation à grande échelle des ressources génétiques commence à se développer car les techniques nécessaires à leur régénération sont disponibles. Les ressources génétiques des espèces mammaliennes peuvent être conservées sous la forme de gamètes (ovocytes et spermatozoïdes) mais aussi sous la forme d'embryons dans différents laboratoires de recherche (Boettcher et al., 2005). Chez les poissons, la conservation des ovocytes lécithiques et des embryons reste impossible de nos jours. La cryoconservation du sperme est possible (Zhang et

al., 2007) mais il est bien admis que le sperme ne transmet pas le génome mitochondrial à la descendance. Le transfert nucléaire et/ou de cytoplasme ne permet pas non plus de régénérer les ressources génétiques de manière intègre (risque d'hétéroplasmie mitochondriale). La seule technique de régénération possible à ce jour consiste à récupérer les cellules souches germinales qui peuvent être cryoconservées. Une fois transplantées de manière appropriée dans un individu receveur, ces cellules ont la capacité de générer des ovocytes et des spermatozoïdes fonctionnels et génétiquement identiques à ceux produits par les individus donneurs des cellules souches germinales.

Les applications des biotechnologies basées sur la transplantation des cellules germinales souches des poissons dépassent largement le domaine de la biologie de la conservation et constituent une perspective de développement économique prometteuse pour l'aquaculture. En effet, il est désormais possible d'envisager la production de chimères germinales interspécifiques (« surrogate production ») où une espèce (ou une lignée), dont l'élevage est bien maîtrisé, est utilisée comme souche porteuse pour la production de gamètes d'une autre espèce plus difficile et/ou plus coûteuse à élever en captivité en raison de la taille des géniteurs ou d'une puberté tardive (flétan, thon...). Cependant, ces applications resteront limitées par le faible nombre de cellules germinales souches pouvant être collectées à partir des animaux donneurs, car il n'existe pas de techniques d'amplification *in vitro* des cellules germinales souches disponibles à ce jour.

### **Problématique Scientifique**

Face aux demandes antagonistes des écloséries et des piscicultures de grossissement concernant la maîtrise de la maturation sexuelle et de la fertilité des poissons, l'équipe d'accueil initialement appelée « Physiologie Testiculaire et Puberté » et récemment restructurée sous l'acronyme MaRé pour « Maturation sexuelle, Cryoconservation et régénération » a orienté son projet de recherche sur l'identification des mécanismes moléculaires intragonadiques impliqués dans l'initiation de la spermatogenèse. Le premier axe de recherche de l'équipe se focalise sur l'étude du rôle et du mécanisme d'action des hormones sexuelles (gonadotropines et stéroïdes sexuels). Il s'agit en particulier d'identifier les voies de

régulation paracrine intra-testiculaires qui relaient l'action des hormones sexuelles pendant la transition pubertaire.

Le deuxième axe de recherche initié en 2010 vise à comprendre comment se construit la décision des cellules spermatogoniales souches de rester quiescente, de se renouveler, ou de s'engager dans un processus de différenciation spermatique au moment de la transition pubertaire et chez l'adulte sexuellement mature. C'est dans le cadre de cette deuxième problématique que mon projet de thèse s'est inscrit.

### **Objectifs de la thèse**

Le programme de recherche de la thèse a eu pour objectif principal d'identifier des mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement impliqués dans le contrôle du devenir des cellules spermatogoniales souches chez le poisson-zèbre adulte. Ce programme a été divisé en deux volets:

- **Caractérisation des spermatogonies indifférenciées**

Comme pour les mammifères, il est généralement bien admis que les cellules souches spermatogoniales ne représentent probablement qu'une petite fraction des spermatogonies indifférenciées. Pour caractériser des entités différentes de spermatogonies indifférenciées, nous avons exploité des lignées transgéniques de poisson-zèbre produites au laboratoire et qui expriment la protéine GFP dans une sous population de spermatogonies indifférenciées sous le contrôle d'un fragment promoteur du gène *vasa*. Pour approfondir la nature des entités cellulaires fluorescentes et en absence des marqueurs discriminants différentes populations de spermatogonies chez le poisson-zèbre, nous avons d'abord cherché à valider, chez cette espèce et par hybridation *in toto* d'ARNm, des marqueurs candidats de spermatogonies souches ou différenciées précédemment proposés chez d'autres espèces. Après la mise au point d'une procédure d'isolement des cellules fluorescentes, la signature moléculaire des entités cellulaires fluorescentes a pu être analysée par qPCR. Les propriétés fonctionnelles des cellules fluorescentes (capacité à coloniser les gonades et à générer des gamètes fonctionnels) ont été analysées par transplantation dans la cavité abdominale d'alevins. Les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des populations spermatogoniales

fluorescentes nous ont amenés à nous interroger sur la dynamique de renouvellement du stock de cellules spermatogoniales souches chez le poisson-zèbre adulte.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce premier volet des recherches nous ont permis de conclure que les cellules spermatogoniales fluorescentes pouvaient faire partie du stock de cellules SSC chez le poisson-zèbre

- Contrôle du devenir des cellules spermatogoniales souches

Sur la base d'une hypothèse selon laquelle le devenir des cellules souches spermatogoniales pourrait être contrôlé au moins en partie par des facteurs paracrines libérés au sein de la niche germinale par les cellules de Sertoli, nous avons entrepris une identification la plus exhaustive possible des récepteurs membranaires présents à la surface des SSC et de leur(s) ligand(s) présentant une origine Sertolienne.

Pour ce faire, nous avons exploité deux lignées transgéniques de poisson-zèbre exprimant la GFP dans les cellules de Sertoli (Gautier et al., 2011a) ou dans une sous population de spermatogonies souches (caractérisé dans le cadre du premier volet), pour purifier ces types cellulaires et établir leur transcriptome par une approche nouvelle au laboratoire basée sur le séquençage à très haut débit (RNAseq illumina). L'annotation des transcrits et l'analyse comparée des profils d'expression de ces derniers dans différentes conditions expérimentales (testicules normaux ou dépourvus de cellules germinales...) ont permis de compléter cette étude pour proposer de nouvelles voies de régulation paracrine d'intérêt et d'essayer d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques aux SSC. Enfin, nous nous sommes interrogés sur l'intérêt générique potentiel de nos résultats notamment en étudiant l'origine et l'évolution des gènes sélectionnés chez les Vertébrés par des approches phylogénétiques.

# **Matériel et Méthode**



# **1. Origine et manipulation des poissons-zèbres**

## **1.1. Origine et entretien des poissons-zèbres**

Les poissons-zèbres (*Danio rerio*) de souche AB ont été récupérés au ZIRC puis élevés dans les installations expérimentales de l'unité LPGP de l'INRA. La première alimentation intervient 3 à 4 jours après l'éclosion, c'est-à-dire 5 à 6 jours après fécondation. L'alimentation se fait 3 fois par jour avec un aliment spécial pour poisson-zèbre appelé Gemma Yean (Skretting) en adaptant la granulométrie en fonction des stades de développement du poisson-zèbre. On commence avec du Gemma 75 (50 à 100µm) à 5 jours après fécondation et l'on va jusqu'au Gemma 300 (200 à 500µm) au bout de 26 jours. Entre le jour 9 et le jour 25, on complète cette alimentation avec des *Artemias* vivants. Après 2 mois, l'alimentation est composée d'un aliment sec de type Gemma Wean (Skretting) pour adulte qui a une composition différente de celle utilisée pour les poissons plus jeunes. L'eau d'élevage est une eau synthétique, préalablement osmosée, puis additionnée de sels pour obtenir une osmolarité de 3 mOsm. L'eau est maintenue à 28°C, à pH 7,5 et est saturée en oxygène. Les poissons-zèbres sont maintenus pendant les 15 premiers jours de vie dans un bac de 250 ml et l'eau d'élevage est dégraissée en surface tous les jours et elle est renouvelée tous les 2 jours. À partir de 1 mois, les poissons-zèbres sont maintenus dans un système d'aquarium permettant la recirculation de l'eau d'élevage à 28°C et pH 7,5 saturée en oxygène. Les poissons-zèbres sont exposés à une photopériode alternant 16h de lumière et 8h d'obscurité. Les descendants sont obtenus de manière naturelle et l'observation, les prélèvements ou l'euthanasie, ont été réalisés après une anesthésie au phénoxyéthanol à 0.03% dans l'eau d'élevage. Les procédures utilisées sont en agrément avec le guide de conduite de l'utilisation et la préservation du bien-être des animaux établi par l'école de vétérinaire de Nantes.

## **1.2. Production de poissons-zèbres dépourvus de cellules germinales**

Un mâle et une femelle poissons-zèbres de la lignée Dr\_vasa :eGFPtoI2 C3 sont isolés la veille et maintenus séparés par une cloison transparente. Le lendemain, la cloison est retirée au moins 30 minutes après le début de la période

d'éclairage. Les embryons de poissons-zèbres sont collectés après la parade du mâle et la ponte des œufs par la femelle.

Les embryons ont été déchorionnés en incubant les embryons dans une solution de Holfreter contenant 0.5mg/ml de pronase isolée de *Streptomyces griseus* (Sigma P8811). La digestion est conduite à température ambiante et surveillée sous loupe binoculaire. La réaction enzymatique est arrêtée en transférant les embryons dans une solution de Holfreter contenant 1,6 % de blanc d'œuf battu. Les embryons déchorionnés sont lavés et maintenus dans la solution de Holfreter. Les embryons déchorionnés ont été injectés dans le vitellus localisé en dessous du disque embryonnaire avec une solution de morpholino anti-dead end (5'-GCTGGGCATCCATGTCTCCGACCAT-3'), à 50mM final, entre les stades une et quatre cellules. Les animaux survivants à 24h ont ensuite été élevés selon les procédures standard d'élevages décrites précédemment.

### **1.3. Production de poissons-zèbres triploïdes**

Un mâle et une femelle poissons-zèbres de la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2 C3 sont isolés la veille et maintenus séparés par une cloison transparente. Le lendemain, les ovocytes de la femelle sont recueillis sous anesthésie par un léger massage abdominal. Notez que les œufs sont recueillis à sec et toute trace d'eau doit être éliminée de la papille urogénitale. Les œufs sont ensuite repris dans du liquide coelomique de truite et déposés sur le fond d'une boîte de Petri. Le sperme est recueilli sous anesthésie au niveau de la papille urogénitale du mâle après un léger massage abdominal. Le sperme est dilué dans le milieu d'immobilisation HBSS à 300 mosm/kg pour avoir une concentration comprise entre 100 et 400 millions de cellules/ml. L'excès de liquide coelomique de truite est retiré et une goutte de 20 µl de sperme est déposée à proximité des œufs. La fécondation est initiée en mélangeant les gouttes de sperme et d'œufs avec 1 ml d'eau d'élevage à 28°C. Après 30s, 4 ml d'eau sont rajoutés. Après 2 min et 20s par rapport au début de la fécondation, les embryons sont exposés à un choc thermique de 41°C pendant 4 min puis remis brutalement à incuber dans une eau d'élevage à 28°C. Une efficacité de triploidisation de 100% est obtenue.

<b>Méthode</b>	<b>Séquences des amorces</b>	<b>Taille (pb)</b>
<i>Production du Transgène</i>	DrVASAfw2kb	CTCGAGCCTAATTACCCTAACCTGCCTAACT
	DrVASArev32kb	AATCACCGTCTGCTTGATGCT
	DrVASAfw32(attB1)	(GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT)TGCCTAATTAC CCTAAGCCTT (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT)ATATTGGGTAA
	DrVASA(attB2)	TTTAGGTGAGACCTG
<i>Génotypage</i>	DrVASAfw700	TTAGACATGACCGGAAGAGTTG
	GFPtg4	AGACGTTGTGGCTGTTGTAG

**Tableau 2 : Amorces utilisées pour la transgénèse et le génotypage.**

## **2. Production de lignées transgéniques vasa :eGFP**

Les procédures mises en œuvre ont été approuvées par le Comité Rennais d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale (CREEA) sous le numéro de dossier 2016043011266778

### **2.1. Préparation du transgène**

Le fragment promoteur -1481/+506 du gène vasa de poisson-zèbre a été amplifié par PCR ancrée à partir de l'ADN génomique extrait de la souche AB élevée au laboratoire. L'enzyme Accuprime™ taq DNA polymérase (Invitrogen) et les amorces spécifiques DrVASAfw2k et DrVASArev32kb ont été utilisés pour la première réaction de PCR (Tableau 2). La seconde réaction de PCR a été conduite avec le produit de la première PCR dilué au 1:50 et les amorces DrVASA(attB1) et DrVASA(attB2). Le produit de PCR a été inséré dans le vecteur pDONR221 pour générer le vecteur d'entrée Dr\_vasa:pDONR221 en utilisant la clonase BP (Invitrogen). Le vecteur de transgénèse Dr\_vasa:eGFPtol2 a été obtenu par une recombinaison médiée par la clonase LR en mélangeant le vecteur Dr\_vasa:pDONR221 aux 3 autres vecteurs fournis dans le Tol2kit (Kwan et al., 2007): p5E-MCS (élément 5' contenant un site multiple de clonage); p3E-EGFPpA (élément 3' contenant le cadre ouvert de lecture de la GFP et deux sites de polyadénylation de SV40); et pDestTol2pA (vecteur de destination flanqué des motifs répétés tol2 en orientation inverse). Les réactions de recombinaison BP et LR ont été conduites selon les recommandations du fabricant (Invitrogen). Les réactions de séquençage ont été réalisées pour vérifier l'exactitude des séquences du promoteur vasa et des jonctions de clonage. Le vecteur de transgénèse Dr\_vasa:eGFPtol2 a été amplifié dans les bactéries DH5α et purifié en utilisant le kit « EndoFree plasmid purification kit » (Qiagen).

### **2.2. Injection**

Les embryons de poisson-zèbre ont été injectés au stade 1 cellule avec un mélange contenant le vecteur Dr\_vasa:eGFP (6.25 n/μl), la transposase Tol2 (6.25 ng/μl) et du rouge phénol (0.1%). La solution est injectée en utilisant une MPPI-3

Pressure Injection System (Applied Scientific Instrumentation) et des capillaires en verre de borosilicate. (1.0-mm diamètre extérieur × 0.5-mm diamètre intérieur ; GC100FS-10; Harvard Apparatus). Les embryons survivants, mais mal formés ont été éliminés avant la première alimentation.

### **2.3. Production des animaux transgéniques et génotypage**

Les poissons injectés ont été reproduits entre 3 et 4 mois d'âge avec des animaux sauvages. Les fondateurs transmettant le transgène à leurs descendances avec la plus grande fréquence ont été sélectionnés après le génotypage de 10 pools contenant environ 10 œufs. L'ADN génomique a été extrait sur la nuit, à 42°C sous une agitation de 1000 rpm dans 400µl d'un mélange de 10% de chelex et de protéinase K (0.2µg/µl). L'ADN est ensuite purifié après extraction au phénol chloroforme (1 :1), addition de 1 :10 de volume d'acétate de sodium 3M, et précipitation à l'éthanol (2.5 volumes). La concentration à 260 nm a été mesurée en utilisant un Nanodrop 1000 spectrophotomètre (Thermo Fisher Scientifique).

Pour la sélection des transgéniques juvéniles (50 jpf) l'ADN génomique est extrait après une biopsie de la nageoire caudale. La réaction de PCR a été réalisée dans 25µl de solution contenant 150ng d'ADN génomique, 5µM de chaque amorce Drvasafw700 et GFptg4 (Table1), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 1× GoTaq flexi buffer et 0.625 U de GoTaq polymérase (Promega). Les conditions des cycles de PCR étaient les suivantes, 2 min à 95°C puis 35 cycles de 45 sec à 95°C, 45 sec à 50°C et 45 sec à 72°C.

Après la génération F2, les poissons-zèbres transgéniques montrant une forte fluorescence dans les gonades ont été sélectionnés par observation directe en utilisant un AZ100 Macroscrope (Nikon) équipé d'un filtre GFP-BP (520/35 nm) et les photos prises par la camera digital DS-Ril et le logiciel NIS-Elements D 3.0 Software (Nikon Instruments, Amstelveen, Netherlands).

### **3. Analyse de l'expression des gènes**

### **3.1. Extractions des ARNs**

L'extraction des ARN totaux de gonades entières se fait par broyage de 100mg de tissu dans 1ml de solution de TRI-reagent® (Sigma-Aldrich), suivi de l'ajout de 200µl de chloroforme. La solution est ensuite vortexée puis laissée au repos pendant 15min à température ambiante. Une centrifugation de 15min à 8000 g est alors réalisée. La phase aqueuse est prélevée, mélangée à 1 volume d'isopropanol et laissée sur la nuit à -20°C. Une centrifugation de 30min à 14000g permet de culotter les ARN puis ces derniers sont rincés avec de l'éthanol à 70% et séchés à l'air libre. Les ARN totaux sont resuspendus dans de l'eau dépourvue de nucléases et quantifiés avec un nanodrop 1000 (thermoscientific).

L'extraction des ARN totaux des fractions cellulaires triées par FACS est réalisée en suivant le protocole du kit Rneasy plus micro kit (74034, Qiagen). Les ARN totaux sont resuspendus dans de l'eau dépourvue de nucléases et quantifiés avec un nanodrop 1000 (thermoscientific).

Les retro-transcriptions (RT) sont ensuite effectuées le plus rapidement possible afin d'éviter toute dégradation des ARNs.

### **3.2. Choix des amorces spécifiques**

Les amorces ont été choisies à partir des séquences nucléotidiques des ADNc et des gènes correspondants téléchargées de la base de données ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>). Dans le cas de transcrits nouveaux ou des gènes non annotés, nous avons utilisé les séquences nucléotidiques des ADNc déduits des données de RNAseq réalisées au cours de notre étude. Les amorces ont été sélectionnées dans des exons différents lorsque cela était possible pour éviter d'amplifier de l'ADN génomique résiduel. Pour cela, les amorces ont été choisies à l'aide de l'outil en ligne RealTime qPCR Assay Entry (<http://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) d'un prestataire de services (Integrated DNA Technologies). La température d'hybridation ( $T_m$ ) et la conformation des amorces, ont été validées avec l'outil Oligoanalyser 3.1

nom du gène	Séquence des amorces	Concentrations	Tissu	Taille	nom du gène	Séquence des amorces	Concentrations	Tissu	Taille
<b>18s</b>	Fw : CCG-AGG-TTC-GAA-GAC-GAT-CA Rv : GAG-GTT-TCC-CGT-GTT-GAG-TC	100 nM	Testis	226	<b>kit_b</b>	Fw : ACC-GTG-CCT-CAT-AAA-CTC-TTC Rv : GCC-ATC-AAA-ACT-GTC-AAT-CAC-C	300 nM	Testis	150
<b>abcg2a</b>	Fw : GTG-ACA-ACA-GGA-ACA-ACA-GC Rv : CGC-ATG-AGG-AAG-ATG-AA-G	300 nM	Testis	142	<b>lifr_a</b>	Fw2 : TGT-CCA-TGT-TCT-CCT-GCA-TC Rv2 : GAC-GGC-TTC-ATG-TCC-AGA-G	100 nM	Testis	148
<b>acvr2b</b>	Fw : TGT-GTA-GAT-TTC-CCA-TGA-CCC Rv : GAA-TCT-GAA-ATG-ACC-CAA-ACA-GG	100 nM	Testis	174	<b>lifr_b</b>	Fw : AGG-AAG-AGG-GAA-TGG-TTA-AAG-G Rv : AGC-CGT-GAA-CCT-CTT-GAA-TC	300 nM	Testis	142
<b>amh</b>	Fw : AGA-TGG-AGA-GGA-CAG-TGA-AGC-A Rv : ACG-GTA-CTG-AGC-CTC-TTT-GTG-GT	300 nM	Testis	55	<b>mbd3</b>	Fw : CCA-ACC-ATC-CCA-GCA-ATA-AAG Rv : GAG-ATC-CAT-TGT-TTT-GAC-CAA-CTC	300 nM	Testis	137
<b>aqp8b</b>	Fw : ATT-CAC-CAT-CGC-CGT-CTT-C Rv : GCT-TGT-GCA-TAT-TTC-TCG-CTA-G	300 nM	Testis	138	<b>mcm6</b>	Fw : GTC-AGT-TTT-ACC-GAC-CTT-GAG Rv : GAA-CTT-CTC-CAT-GAT-CCC-GAG	300 nM	Testis	127
<b>ccr6a</b>	Fw : CAG-TGG-AGA-TGC-ATA-CCT-TGC Rv : AAA-GAT-GAA-GGT-GGG-AGG-GG	300 nM	Testis	139	<b>nanog</b>	Fw : GGA-GCA-ACA-GGA-TTA-ACA-TAC-AAG Rv : TGA-GAT-TGA-GAA-GCT-GGT-GTG	300 nM	Testis	147
<b>cpeb1a</b>	Fw : GTC-AAC-TCC-GAG-AAC-AGC-G Rv : TCC-AAA-CCA-ACA-TCT-GAG-CC	300 nM	Testis	134	<b>nanos 2</b>	Fw : ACA-GAC-TAA-AGG-CAA-GGG Rv : CTT-TGT-GAT-GTT-TCT-CCG-CG	100 nM	Testis	128
<b>cpeb1b</b>	Fw : TGG-TAG-TTT-GTC-CCA-TCG-C Rv : CAC-TCC-AGG-TAA-AGG-TAG-CTT-C	300 nM	Testis	149	<b>pcdh1</b>	Fw : AAT-GTC-CCC-AGG-TTT-GAG-AGG Rv : CTG-ATG-GAG-GCT-GTA-GGT-AAC	300 nM	Testis	132
<b>c-ret</b>	Fw : TGG-GAC-CTG-TTA-CTG-CTT-TG Rv : GGA-GAA-CGG-AGA-CAA-TGA-AGG	300 nM	Testis	131	<b>piwi 1</b>	Fw : GTC-GCA-CCT-ACT-CAC-TAC-AAT-G Rv : CAA-TTT-GTG-GGC-ATA-CTG-CG	300 nM	Testis	150
<b>cyp17a1</b>	Fw : CTT-ACC-TGG-TCC-ACA-ATC-CAC Rv : CGA-ATC-CTC-AGC-ACT-CTT-CTG	300 nM	Testis	145	<b>piwi 2</b>	Fw : ATC-AAC-GTT-CGG-ACC-ATC-TC Rv : ACA-TCC-ACT-CCA-ATC-ACC-ATC	300 nM	Testis	143
<b>dazi</b>	Fw : CGT-ATG-CCT-ATC-AGT-ATC-CCC Rv : AAG-TGT-TGG-TGA-TGG-GAA-ATT-C	300 nM	Testis	93	<b>pum1</b>	Fw : TGT-ATC-CTG-CCA-ACC-TGT-TC Rv : CTG-TCC-TTG-ACT-TGG-AGT-GAG	300 nM	Testis	146
<b>dnd</b>	Fw : AAG-GGA-AAG-AGG-TTG-TGG-C Rv : TCT-GAC-GGT-GAT-GGA-AAT-GC	300 nM	Testis	116	<b>pum2</b>	Fw : TCC-AGC-CAA-TCT-CTT-CCA-AC Rv : GCT-CTG-TCC-TGG-AGT-TAA-AGG	300 nM	Testis	136
<b>dnmt3ba</b>	Fw : GTG-TAG-AGT-GGT-TTG-GAG-ATG-G Rv : GCT-CTA-GGA-TTT-GGT-AGA-TGG-C	300 nM	Testis	143	<b>pvr1a</b>	Fw : GTT-CCC-AGT-CGA-GAA-ATA-CAC-C Rv : TCC-GTC-AAA-GCC-CTC-AAT-G	300 nM	Testis	129
<b>dnmt3bb</b>	Fw : GTG-GTT-TGG-TGA-TGG-GAA-ATT-C Rv : TTG-GTG-TAG-GAT-GAC-TGG-TTG	300 nM	Testis	96	<b>p2ry</b>	Fw : GAA-ATA-TGA-ACC-TGG-CAA-CTC-G Rv : GAT-AGA-GAA-GCG-GGT-TGA-TGG	100 nM	Testis	135
<b>edc4</b>	Fw : CGA-GAC-AAC-GGT-TTA-GGA-GAC Rv : TGG-CAA-CCT-CAT-CGT-CAT-G	300 nM	Testis	148	<b>plzf1a</b>	Fw : TCA-GCA-TCC-CAT-CAA-GTT-ACA-G Rv : AAC-GTC-TCT-GAA-ATC-CAC-AC	100 nM	Ovaire	139
<b>ednrba</b>	Fw : TGA-CCT-GTG-AAA-TGC-TTC-GG Rv : ACT-AAG-ATG-CAG-TGG-AAG-CC	140			<b>plzf1b</b>	Fw : GAA-GTC-CAT-ACC-CAG-AAA-GAG-C Rv : AGC-CGT-AAA-CTG-TCC-AGA-AAC	300 nM	Testis	149
<b>elongase</b>	Fw : GAT-GAC-CCG-GAT-GTT-CTG-AG Rv : TCT-GTG-TCC-CAT-GAG-TAA-TTG-C	100 nM	Testis	139	<b>pou2</b>	Fw : CGC-GCT-TGG-AAA-CTT-GTA-TG Rv : GAG-GGT-TCT-CGG-AGT-TTT-CG	100 nM	Testis	146
<b>esama</b>	Fw2 : GTC-GTC-TGG-AAC-TAC-ATG-CA Rv2 : GTT-GGT-GTT-GGG-CAT-ATT-GTG	100 nM	Testis	132	<b>rnf17</b>	Fw : AGC-ACA-TTA-AAA-CCC-TCC-CG Rv : GTC-CCT-GAT-CCA-CAT-ATC-GAA-C	100 nM	Testis	148
<b>fgf2</b>	Fw : TCT-GTA-CCA-ACC-GTT-TCC-TTG Rv : TGC-GGG-ATC-TGT-ATG-TGT-TG	300 nM	Testis	126	<b>rtsh</b>	Fw : ATGGCCGTTTCAGTCTACTCTC Rv : CTCCAGTCACGTTGCACATTTG	300 nM	Testis	157
<b>gcl</b>	Fw : TTC-AAG-AGG-AAC-ACG-CTG-AG Rv : GTT-GAA-CGA-CTG-CAA-ACC-AC	300 nM	Testis	127	<b>sall4</b>	Fw : GAA-CIT-TTC-ATC-TGC-CAG-TGC Rv : TCC-ACA-TAT-GAG-TCC-CAA-CAT-G	300 nM	Testis	125
<b>gfp</b>	Fw : GACGTAACCGCCACAAGTTTCAG Rv : CAGATCAGCTTTCAGGGTTCAGCTT	300 nM	Testis		<b>sox2</b>	Fw : CAT-GAA-GGA-ACA-CCC-GGA-TTA Rv : CAG-GGT-GTA-CTT-GTC-CTT-CTT-C	300 nM	Testis	80
<b>gfra1a</b>	Fw : TTG-AGC-GAA-CTT-ACA-ACG-GAT Rv : GTA-AGA-CTC-CTC-GGC-AGA-TAA-C	300 nM	Cerveau	99	<b>symp1</b>	Fw : GAAGGAAACAAAGTGAAGCA Rv : CCTCCATCTCTTTCATTTTAC	600 nM	Testis	160
<b>gfra1b</b>	Rv3 : FAAG-AAC-AGT-CCA-GTC-CAC-CAG-A Fw3 : AAA-AGC-AAT-GTT-ACT-CTG-GAC-G	300 nM	Testis	120	<b>tex14</b>	Fw : CCG-GAG-CAC-AAC-CTA-TTC-TAG Rv : CAT-CTT-TCT-GGC-CCT-CTG-ATA-G	300 nM	Testis	149
<b>gpat2</b>	Fw : AGA-GTG-GAA-AGT-GTC-GTG-TG Rv : GAG-GGA-GTT-CAG-GCA-TAA-CAG	300 nM	Testis	144	<b>tmx3</b>	Fw : GGC-TCT-CCT-GTG-AAT-GTT-GG Rv : TGT-TGT-TGG-CCC-TTT-GTA-GTC	300 nM	Testis	135
<b>gpr37a</b>	Fw : CTG-TAA-GAT-TAT-TCC-CTA-TAT Rv : GGA-AAC-GGT-CAA-TGC-ACA-AAG	83			<b>tnsf15</b>	Fw : ACC-TTC-ACG-CTT-ATG-TAT Rv : ACA-TCT-CTA-GTC-TTA-ACG-GCA-AG	300 nM	Testis	164
<b>gpr144</b>	Fw : TGT-TCA-CCC-GTT-CCT-TCT-G Rv : TCA-ACC-CAG-AGA-TGA-GAA-TTT-GG	300 nM	Testis	145	<b>tspan 820</b>	Fw : AGC-GTC-TAA-ACC-CTG-GAA-AC Rv : CAG-TAA-CGA-TCC-TTC-AAG-CTG-T	182		
<b>gsdf</b>	Fw : AAC-AGC-ATC-CAC-TCA-CCG Rv : CAC-TGG-ACG-AAG-GCC-AC	300 nM	Testis	149	<b>tspan 821</b>	Fw : GCC-AAG-GAT-GAC-CTA-AGA-GAA-G Rv : CAG-TAA-CGA-TCC-TTC-AAG-CTG-T	250		
<b>gtsf</b>	Fw : TGT-GTG-ATG-AAG-ACT-GGG-ATG Rv : GGA-AGA-ACT-CTT-GGT-GCT-CTG	300 nM	Testis	110	<b>tudor1</b>	Fw : CAA-GCA-ATC-CCC-TGT-TCT-CTA-G Rv : TTT-ACC-CAG-AAT-CTC-AAC-CCG	300 nM	Testis	123
<b>hmp19</b>	Fw : CAG-TAT-CAA-GCC-CCA-GAC-AAG Rv : CTC-AGA-AAC-TCC-ATC-GGT-CAC	300 nM	Testis	132	<b>tudor9</b>	Fw : GGG-TAC-AGG-AGT-AAG-TTG-AGC Rv : GTT-TTC-TTT-GCC-CCA-TTC-CAG	300 nM	Testis	118
<b>id4</b>	Fw : ACG-GGT-GTC-AAT-AAG-GAA-GAC Rv : ATT-AGT-TTC-AGT-CCT-GCT-CCA-C	100 nM	Testis	150	<b>thy1a</b>	Fw : ATG-TGG-ATT-CTT-GTC-CTG-GG Rv : CGT-GTG-GAA-GCT-GTG-TTT-G	100 nM	Cerveau	138
<b>igf3</b>	Fw : CCG-AGA-CAG-AGG-CCT-TTA-CAT-AG Rv : CAC-TTT-CTT-GGA-TTT-GGC-ACA-G	300 nM	Testis	148	<b>thy1b</b>	Fw : CCG-GTG-TCA-ATC-ATT-CAA-ACT-G Rv : GAT-CCA-ATT-CAT-GCT-CAC-AGA-AG	100 nM	Testis	146
<b>lgfr1a</b>	Fw : TTT-GGC-ATG-ACG-AGG-GAC-ATC Rv : TCC-CAT-AAA-ACC-ACA-CCA-AAC	300 nM	Testis	152	<b>vasa</b>	Fw : TGATATTCCTGTGACCTGAGTG Rv : AGTGAGTCAACAAGTCCCTGCTT	300 nM	Testis	81
<b>lgfr1b</b>	Fw2 : TAA-TGA-AGC-CTC-CGT-GAT-GAA-A Rv2 : AGT-AAC-TCT-TCA-GAT-CTC-CTC	300 nM	Ovaire	132	<b>hspa8</b>	Fw : CTG-AAC-AAG-AGC-ATC-AAT-CCT-G Rv : AGC-GGT-CTC-AAT-TCC-CAA-AG	300 nM	Testis	143
<b>lgfr2</b>	Fw : TCT-GTT-TGC-TTG-TTC-TCC-TG Rv : TCT-TCA-TCC-ATG-TTC-ACC-CTG	300 nM	Testis	127					
<b>inhibine alpha</b>	Fw : AGG-TCA-TTC-TGT-TCC-CAA-GC Rv : AGA-ACC-AGA-AGT-GTG-CAG-AAG	100 nM	Testis	147					
<b>inls3</b>	Fw : TCA-GAC-CTT-CAC-TTC-GCA-TAC Rv : CCT-CCA-CTG-CTC-ATC-TTC-AAC	300 nM	Testis	108					
<b>kit_a</b>	Fw : CTG-TCT-CTG-CGA-GTG-GTA-ATG Rv : TTC-ATA-GGA-CAC-AAT-CTG-CGG	300 nM	Ovaire	148					

**Tableau 3 : Liste des amorces de gènes de poisson-zèbre utilisées en qPCR**

Les lignes grisées correspondent aux couples d'amorce n'ayant pas pu être validé sur une gamme de tissus.

(<http://eu.idtdna.com/calc/analyze>) proposé par ce même prestataire. La liste des différentes amorces est présentée dans le tableau 3.

### **3.3. Rétro-transcription (RT)**

La réaction de rétro- transcription des ARN totaux est réalisée dans 20µl de solution contenant 2µg d'ARN totaux, 1µg d'hexamère (Promega), 0.2 mM dNTP et 200 U de Mouse Moloney Leukemia Virus reverse transcriptase (Promega). La réaction de rétro-transcription a été conduite à 37°C pendant 75 minutes puis stoppée en augmentant la température à 70°C pendant 15 minutes.

Des contrôles négatifs sont réalisés en faisant les mêmes préparations, mais en remplaçant l'ARN par de l'eau dans un cas et l'enzyme par de l'eau dans l'autre cas.

### **3.4. PCR quantitative (qPCR)**

L'amplification est réalisée avec des solutions d'ADN complémentaire diluées au 1 :10, 1x Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) et 100 ou 300 nM de chaque primer (Tableau 3). Tous les échantillons sont traités en duplicata et l'efficacité des primers a été vérifiée au préalable en réalisant une série de dilutions d'un extrait riche en ADNc cible. Seuls les couples d'amorces montrant une efficacité d'amplification proche de 100% ont été retenus pour nos études.

La PCR quantitative (Q-PCRs) est conduite en utilisant le thermocycler StepOne Plus (Applied Biosystems). Les conditions de cycle sont les suivantes : 95°C pendant 20 secs, suivis de 40 cycles à 95°C pendant 3 secs et 60°C pendant 30 secs. Afin d'être sûr qu'un seul produit a été amplifié, chaque réaction est suivie de l'analyse d'une courbe de fusion consistant en 50 cycles de 1 sec passant de 65°C à 90°C à raison d'une augmentation de +0.5°C par cycle. L'abondance relative des transcrits est alors déterminée en utilisant la méthode dite des  $\Delta$ CT (Livak and Schmittgen, 2001) et les valeurs sont normalisées par rapport au gène 18S qui sert de référence.



Nom gènes	Séquences des amorces	Taille (pb)	Nom gènes	Séquences des amorces	taille (pb)		
<i>adad2</i>	Dr_adad2_cDNA_F Dr_adad2_cDNA_R	GAA-TGC-CCA-GAA-TAC-CAC-AG TGC-TGT-GGT-ATT-CTG-GGC-ATT-C	1214	<i>hspa8</i>	Dr_hspa8cDNA_Fw Dr_HSPA8cDNA_Rv	CTC-TGA-GTT-CAA-GCG-CAA-ATA-C CTC-AAT-GTC-CTC-CTT-GCT-TAG-A	823
<i>cd9a</i>	Dr_CD9acDNA_Fw Dr_CD9acDNA_Rv	TGT-TGG-ACT-GTG-GCT-GAG-GTT-TGA AAA-TGG-GCT-TGG-GAC-GCT-AAA-C	797	<i>id4</i>	Dr_ID4_Fw3 Dr_ID4_Rv3	CGG-TTC-GCC-CTC-ATA-AGC-TTC TGA-GAA-ATC-GGA-CTG-GCA-TCA	557
<i>cd9b</i>	Dr_CD9bcDNA_Fw Dr_CD9bcDNA_Rv	GGT-GCT-CAG-TTT-TGG-GTT-TCT AAC-CAC-TGC-CGC-ACA-TTC-ACA-A	811	<i>igfr1b</i>	Dr_igfr1b_Fw2 Dr_igfr1b_Rv2	TAA-TGA-AGC-CTC-CGT-GAT-GAA-A CCC-ACA-AAA-CCA-CCC-CGA-AA	465
<i>c-kita</i>	Dr_c-KITa_Fw3 Dr_c-KITa_Rv3	CAG-GTT-GCC-AGC-AGC-ACC-AGG CAC-TGT-CTA-AAA-GTT-TGA-TGC	1159	<i>insl3</i>	Dr_Insl3cDNA_Fw Dr_Insl3cDNA_Rv	ACC-CCG-AGA-AAC-ACC-ATG-AA ACA-TGA-GTC-CAC-AAA-TGC-TAC-CTG	821
<i>c-kitb</i>	Dr_ckitb_fw Dr_ckitb_Rv	TCC-ACG-GGA-AAG-ACT-GCG-CT CTG-TTG-AGC-TGC-CCA-CTG-AG	1163	<i>lhrc</i>	Dr_lhrcDNA_Fw Dr_lhrcDNA_Rv	CAA-TGC-TTT-CAC-CGG-GAT-GAC GCA-CCA-ACG-TTA-AAG-AGC-AAC-AGG	1158
<i>c-ret</i>	Dr_c-ret_Fw3 Dr_c-ret_Rv3	CTC-TCT-GTA-ATA-TCC-TGA-AT AGA-GCC-TAG-AAA-TAT-CAT-TAC	1121	<i>ly75</i>	Dr_ly75_fw3 Dr_ly75_Rv2	ATG-GAT-GAT-GCT-AAG-AAT-GTG GCA-GAG-TGG-CAT-TCA-GAA-ATC	1064
<i>csfr</i>	Dr_CSFR1a_Fw2 Dr_CSFR1a_Rv2	GGA-CAT-GAG-ACC-AGT-CAC-ATC-C TCT-GGA-AAA-TTC-AAG-CCG-ATG	912	<i>mbd3b</i>	Dr_mbd3b_cDNA_F Dr_mbd3b_cDNA_R	CAT-TGT-CAC-AGA-TGA-GGA-TAT TTA-ACA-AGC-ACC-AGA-CAT-GAG	1000
<i>cyp17</i>	Dr_Cyp17a1cDNA_Fw Dr_Cyp17a1cDNA_Rv	AGT-ACA-GCC-AGG-GAA-TCG-TG CTG-AGC-GCC-GTC-TGA-AAT-GAT	1104	<i>mcm6</i>	Dr_mcm6cDNA_Fw Dr_mcm6cDNA_Rv	GAG-CAG-CAG-TTT-AAA-TAC-ACT-CAG-C CAA-GAT-GGA-TGT-GCG-GGC-ATT-C	996
<i>dazl</i>	Dr_DAZLcDNA_Fw Dr_DAZLcDNA_Rv	CGG-TCG-ATT-ATG-TGC-ATC-T GAC-CCT-ATC-TGC-AAC-GGT-GT	1053	<i>nanog</i>	Dr_nanogcDNA_Fw Dr_nanogcDNA_Rv	TGT-ACC-CGC-AAG-TGT-CAG-AG AGG-GCT-GCT-TTC-TTT-GTT-CA	1022
<i>dnd</i>	Dr_DndcDNA_Fw Dr_DndcDNA_Rv	CCT-GCT-CCT-GGT-TCG-GGC-TGT TTA-TAG-TCA-GTA-CAA-CCC-ATC	1500	<i>nanos2</i>	Dr_nanos2cDNA_Fw Dr_Nanos2cDNA_Rv	CAT-GAT-GCA-GTC-AGA-GAG-TCA-G TTC-AGC-ATT-GGT-TGA-TTT-AGA-AG	458
<i>dnmt3bb</i>	Dr_dnmt3bb1_cDNA_F Dr_dnmt3bb1_cDNA_R	GTG-ATG-ATT-GAC-GCC-ATA-GAG TAC-TGT-TAT-TGT-GCA-ACG-AT	1007	<i>nanos3</i>	Dr_Nanos3cDNA_Fw Dr_Nanos3cDNA_Rv	TTG-GAA-GGA-CTA-CAT-GGG-TT ATG-AAA-ATA-TGG-CGA-TTA-TG	909
<i>edc4</i>	Dr_Qf_EDC4_Fw Dr_EDC4cDNA_Rv	CGA-GAC-AAC-GGT-TTA-GGA-GAC CTG-AAT-AGG-ACC-CTG-CA	813	<i>ntla</i>	Dr_NTLacDNA_Fw Dr_NTLacDNA_Rv	TTT-AGA-AGG-GCA-GCG-AGA-AAG-G ACT-TGG-GTA-CTG-ACT-GGT-G	959
<i>endothéline</i>	Zf_Edn2_cDNA_Fw2 Zf_Edn2_cDNA_Rv2	TCA-CAA-GGA-CAA-AAC-TAG-T CTA-TTG-AAA-CTT-GCT-GGT-ATC-T	931	<i>ntlb</i>	Dr_NTLbcDNA_Fw Dr_NTLbcDNA_Rv	TTT-AGA-AGG-GCA-GCG-AGA-AAG-G CAC-CAG-TCA-GTA-CAC-CAG-C	968
<i>esama</i>	Dr_esama_Fw2 Dr_esama_Rv2	GTC-GTC-TGG-AAC-TAC-ATG-CA GTT-GGT-GTT-GGG-CAT-ATT-GTG	1099	<i>pcdh1</i>	Dr_Pcdh1_448Fw Dr_Pcdh1_448Rv	CTG-TCG-TGT-GAG-GTG-ATT-GT ACT-GGT-GAT-GAT-GGC-TGA-TG	781
<i>etv5a</i>	Dr_etv5a_Fw Dr_etv5a_Rv	GAC-GGA-TTT-TAT-GAC-CAG-CAA AAC-CTT-TAC-CIT-CTG-CAT-GAT	1344	<i>plzf+a+b</i>	Dr_PLZF_Fw Dr_PLZF_Rv	GGT-TCG-GTA-AAT-CTT-GAT-GTT GCT-TCA-CAC-GTA-GCA-GAG-GTA	1402
<i>etv5b</i>	Dr_etv5b_Fw Dr_etv5b_Rv	ATG-GGT-TTT-ATG-ACC-AGC-AA AAC-CTT-TAC-CIT-CTG-CAT-GAT	1343	<i>prosaposine</i>	zf-psap cDNA_Fw zf-psap cDNA_Rv	CTCAGTGTGCATCTGTGAATA GCACGCATCTCTCAGTAAA	822
<i>gcl</i>	Dr_gclcDNA_Fw Dr_gclcDNA_Rv	TTC-AAG-AGG-AAC-ACG-CTG-AG CAT-ACT-GTA-GTT-TGG-TCC-AAC	1425	<i>rnf17</i>	Dr_rnf17cDNA_Fw Dr_rnf17cDNA_Rv	GGC-AGA-TGG-AGT-GTA-AGA-GAA-TAG GCC-TCC-GTA-GAC-ACT-CAT-TAA-G	948
<i>gfra1a</i>	Dr_GFRA1a_Fw3 Dr_GFRA1a_Rv3	TTT-ATC-CTG-CTG-CCT-TGC-GAG-TC AAT-GCT-GAT-AGA-TCC-CCC-AGT-A	550	<i>sall4</i>	Dr_Sall4cDNA_Fw Dr_Sall4cDNA_Rv	TGT-CGT-AAA-AGC-CCT-GCC-ACA-A GTT-GAC-CTC-TCC-TTG-CTG-TAT-T	904
<i>gfra1b</i>	Dr_GFRA1b_Fw3 Dr_GFRA1b_Rv3	GTT-AGG-GCT-CAT-GAA-CAG-T AAA-CGG-AAA-AGC-AGA-GTG-TGA	614	<i>thy1a</i>	Dr_Thy-1a_fw3 Dr_Thy-1a_Rv2	TCT-TAT-TCT-ATG-TTA-ATG-TGG-A AAT-ACC-ATC-ATA-GAG-GCA-GCA-A	616
<i>gpat2</i>	Dr_gpat2_cDNA_R Dr_gpat2_cDNA_R	AGT-TCA-GGC-ATA-ACA-GCG-TCT TGC-AAC-ACT-CCT-CCT-CTG-G	1073	<i>thy1b</i>	Dr_Thy-1b_fw Dr_Thy-1b_Rv	GTG-ATC-AGG-ATG-TTC-TAC-ACC TGT-CAC-ATT-TAC-AAC-AGC-ACA	679
<i>gpr125</i>	Dr_GPR125_Fw2 Dr_GPR125_Rv2	CCT-GTT-TAT-TCG-GAG-CCC-TCG-C ACG-TCA-TGC-ATT-TTC-ACA-TAC	1042	<i>tmx3</i>	Q_Zf_TMX3_Fw Dr_TMX3_Rv	GGC-TCT-CCT-GTG-AAT-GTT-GG TTC-TTT-CCA-TGT-GTA-T	1049
<i>gtsf1</i>	Dr_gtsf1cDNA_Fw Dr_gtsf1cDNA_Rv	AAC-ATG-TGT-AGA-TCG-ATG-CTC-TGT-TAC CCG-GTT-CTT-TTT-GTG-AGT-AAG-T	933	<i>tnsf 15</i>	Dr_TNFSF15cDNA_Fw Dr_TNFSF15cDNA_rv	CAC-GTG-GGA-GAA-TCG-TGT-AT GCA-GAG-TGG-TTT-CTT-TGA-TGT-AG	535
<i>gtsf1</i>	Dr_gtsf1tconsDNA_Fw Dr_gtsf1tconsDNA_Rv	GGC-TAA-GGA-CAA-GAC-TGA-TAG-C GTG-TGA-TGT-TGG-CAC-AAA-CTA-C	682	<i>tspan 4b 820</i>	Dr_tspan4B820Fw Dr_tspan4B820+821Rv	AGC-GTC-TAA-ACC-CTG-GAA-AC TCT-GAG-GAT-CTG-GCA-GTA-CA	440
<i>gtsf1 2</i>	zf-GTSF1 tcons2 cDNA_Fw zf-GTSF1 tcons2 cDNA_Rv	TTGATTGAAGCGGCTCAACAAAAC TCCTTAGGAAGCGGATTTGGACAC	493	<i>tspan 4b 821</i>	Dr_tspan4B821Fw Dr_tspan4B820+821Rv	GCC-AAG-GAT-GAC-CTA-AGA-GAA-G TCT-GAG-GAT-CTG-GCA-GTA-CA	330
<i>hmgb2a</i>	Dr_hmgb2acDNA_Fw Dr_hmgb2acDNA_Rv	CCC-AAC-CAA-TCA-GAT-GAG-AGC CAC-AGT-GAA-AAG-GGG-AAA-CAG	1132	<i>tubulineα</i>	Dr_tubulinalphacDNA_Fw Dr_tubulinalphacDNA_Rv	GAC-GAG-CAT-GGA-ATT-GAC-CCA-ACA ACA-CCA-GGT-CGT-TCA-TGT-TGC-T	1183
<i>hmgb2b</i>	Dr_hmgb2bcDNA_Fw Dr_hmgb2bcDNA_Rv	GAC-GAG-TTG-ATC-AGC-CAT-GGT-GAA TCA-GTG-GAG-CTA-AGT-CAC-GC	682	<i>tudor1</i>	Dr_trdr1_cDNA_F Dr_trdr1_cDNA_R	GTG-GCA-CTT-TCC-AAC-CAA-GAG GAA-GAA-GTC-GAT-GGT-TAC-AGG-T	1071
<i>hmgb3a</i>	Dr_hmgb3acDNA_Fw Dr_hmgb3acDNA_Rv	CCC-AAG-GGC-AAG-ATG-TCT TGC-TCT-CAC-ACA-CAC-ACG-AA	822	<i>tudor9</i>	Dr_tudor9_cDNA_F Dr_tudor9_cDNA_R	GTC-ATG-CCT-GCC-ACA-CAC-C AGA-CAA-CCA-CTG-CAT-CAA-CT	1076

**Tableau 4 : Liste des amorces de gènes de poisson-zèbre utilisées en Hybridation In Toto (HIT).**

## **4. Hybridation In toto d'ARN messenger (HIT)**

### **4.1. Production des ribosondes**

#### **4.1.1. Clonage**

Le cadre ouvert de lecture de la GFP a été cloné à partir du plasmide p1.72BSSPE/ISceI/RfAVenus (Gautier et al., 2011a). Les ARN totaux de testicules, d'ovaires ou d'embryons de 16 jours ont été rétro-transcrits dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2 µg d'ARN total, 1 µg d'oligoDT, 0.1 µg d'hexamers, 0.2 mM dNTP, 1 U de RNAsin et 200 U de MMLV-RT selon les recommandations du fabricant. Les ADNc des gènes d'intérêt ont été amplifiés en utilisant la polymérase GoTaq® flexi DNA (Promega) et des amorces spécifiques appropriées permettant de générer des fragments d'environ 1 kb lorsque cela était possible (Tableau 4). Les produits de PCR ont été purifiés sur des colonnes NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel) puis insérés dans le vecteur pGEM-T easy (Promega). Les plasmides ont été amplifiés dans les bactéries TOP10 (Invitrogen) et extraits en utilisant le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel). Les plasmides recombinants ont d'abord été sélectionnés en réalisant une digestion préalable de l'ADN plasmique par l'enzyme EcoR1 (0.5 unité / µg d'ADN) et une séparation des fragments de digestion sur gel d'agarose à 1% dans le tampon TAE 1X. Les plasmides recombinants d'intérêts ont ensuite été envoyés en séquençage chez un prestataire de service Eurofins). La séquence nucléotidique obtenue a été analysée avec le logiciel bioedit (Hall, 1999). Tous les ADNc amplifiés utilisés montrent une identité supérieure à 99% avec les séquences correspondantes téléchargées de la base de données ENSEMBL et/ou obtenue par RNAseq.

#### **4.1.2. Synthèse et validation des sondes**

Des matrices contenant les ADNc flanqués par deux sites de fixation pour les polymérases T7 et SP6 sont amplifiées par PCR en utilisant les amorces forward et reverse M13. Les ribosondes sens et antisens, marquées à la digoxigenine ou à la biotine, sont produites à partir du produit de PCR en utilisant le kit Riboprobe *in vitro*

<b>Anticorps primaire</b>	<b>Dilution</b>	<b>Révélateurs</b>
Anti-Digoxigenin-POD (roche 11207733910)	1/500	TSA-CY3 ou TSA-FITC (1/50)
Roche-11093274910, Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	1/2000	NBT (4.5µL/ml) et BCIP (3.5µl/ml)
Anti-Biotin–Peroxidase (A4541 Sigma-Aldrich)	1/1000	TSA-CY3 ou TSA-FITC (1/50)

**Tableau 5 : Liste des anticorps et révélateurs utilisés en HIT**

<b>Anticorps primaire</b>	<b>Dilution</b>
Anti-nanos2 (Ab174139)	1/100
Anti-gfp (Ab13970)	1/500
Anti-gfra1 (Ab84106)	1/200
Anti-SSEA1 (MC480 P3-X63-Ag8 DSHB)	1/500
Anti- EMA-1 (NS-1 DSHB)	1/500
Anti-STELLA (Ab 19878)	1/500
Anti-H3K27me2me3 (39538 Active Motif)	1/500
Anti-H3K9me2 (39683 Active Motif)	1/500
Anti-H3K9me3 (Ab 8898)	1/500
<b>Anticorps Secondaires</b>	<b>Dilution</b>
Anti-rabbit-Cy3 (JIR 111 166 003)	1/500
Anti-mouse-Cy3 (JIR 115 165 003)	1/500
Anti-chick-AF488 (Life A-11039)	1/500
Anti-rabbit-alexa 594 (Life A-11012)	1/400

**Tableau 6 : Liste des anticorps et révélateurs utilisés en HIT**

transcription systems kit (Promega), la digoxigenine-UTP (Roche) et la biotine-UTP (Roche). La taille et l'intégrité des ribosondes sont vérifiées avec le Bioanalyser 2100 (Agilent) en utilisant l'Agilent RNA 6000 Nanos kit (Agilent Technologies) en accord avec les instructions du constructeur.

#### **4.2. Hybridation**

Les testicules entiers sont prélevés et fixés dans du paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS, durant toute la nuit à 4°C. Ils sont ensuite lavés plusieurs fois au PBS, placés dans du méthanol, puis stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation. L'hybridation *in toto* est réalisée en utilisant un robot In Situ Pro Vs (Intavis, Köln, Allemagne) dans un volume de travail de 700µL. Les tissus sont d'abord progressivement réhydratés dans du PBS-T (0.1%Tween 20 + PBS) à température ambiante. Ensuite, un traitement de perméabilisation à la protéinase K (25 µg/ml) est réalisé à 37°C pendant 20 min. La réaction est stoppée par un lavage avec de la glycine (2mg/ml dans PBST). Les tissus sont rincés 3 fois 2 min dans le PBS-T, refixés dans 4% PAF/PBS pendant 20min, puis rincés 2 fois 20 min dans le PBS-T. Les tissus sont alors conditionnés 2 fois 1h à 65°C dans un tampon de pré-hybridation (50% de formamide, SSC 5x, 0.1% tween20, 0.05% héparine, ARNt levure 0.1mg/ml dans de l'eau DEPC). L'hybridation se déroule pendant 16h à 65°C dans le tampon d'hybridation contenant 500ng/ml de ribosondes. Les tissus sont ensuite lavés dans différentes solutions contenant de la formamide 50%/SSC2x à 65°C, puis SSC2X/1%tween à 55°C et finalement SSC0.2x1% tween à 55°C. Les étapes suivantes sont réalisées à température ambiante. Les tissus sont rincés 4 fois 30min avec du PBS-T et incubés 1h dans une solution de blocage (2% de sérum de mouton, 0.2% tween20, 0.2% de triton X100). Les anticorps sont déposés dans la solution de blocage à la concentration recommandée (Tableau 5). L'anti-dig-Fab couplé à la phosphatase Alcaline (Roche, 1/2000), l'anti-biotine-Fab couplé à la peroxydase (Roche 1/2000) et l'anti-dig Fab couplé à la peroxydase (Roche 1/300) sont ajoutés et incubés à 4°C sur la nuit. Les tissus sont ensuite rincés 4 fois 40 min avec du PBS-T avant de commencer les révélations.

### **4.3. Révélations**

#### **4.3.1. Révélation à l'aide de substrats chromogéniques**

Les échantillons traités avec l'anticorps couplé à la phosphatase alcaline sont pré-incubés dans 3 bains successifs de 30 min dans un tampon AP (120mM NaCl, 60nM MgCl<sub>2</sub>, 120 mM Tris pH9.5 dans de l'eau DEPC). Les tissus sont transférés dans une plaque 24 puits contenant une solution de NBT (4.5µL/ml) et BCIP (3.5µl/ml) préparée dans le tampon AP. La durée maximale de révélation a été limitée à 6h à température ambiante pour éviter la montée du bruit de fond. Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois dans du PBS, fixés à 4% PAF/PBS pendant 45 minutes, puis rincés 3 fois dans du PBS avant d'être stockés à 4°C. Ils sont ensuite déshydratés, en utilisant l'automate Citadel 1000 (Life science International, Cergy-Pontoise, France) et inclus en paraffine. Des coupes de 7µm sont étalées sur des lames de verre en présence d'ovalbumine à 0.03%. Des lamelles sont alors montées avec un mélange mowiol/ Hoescht (0.1µg/ml). Après un temps de séchage de 72h, les coupes sont observées et photographiées avec le microscope ECLIPSE 90i et le logiciel NIS Advanced Research software (Nikon Instruments, Amstelveen and the Netherlands).

#### **4.3.2. Révélation à l'aide de substrats fluorescents**

Les échantillons traités avec les anticorps couplés à peroxydase sont conditionnés par 3 bains de 10min dans une solution de TNT (0.05% Tween20, 150mM NaCl, 100 mM Tris pH7.5 dans de l'eau DEPC). Les tissus sont alors transférés dans une plaque 24 puits et mis en incubation dans une solution de Tyramide Amplification Signal (TSA) contenant du Cy3 (1/50) pendant au moins 10 minutes. On les lave ensuite 3 fois 5 minutes sous agitation, puis on les incube 10 minutes dans une solution de 50%formamide/SSC2x afin de désactiver les peroxydases. Les tissus sont rincés 3 fois 5 minutes dans le tampon TNT, puis incubés 2h dans la solution de blocage, avant de déposer le deuxième anticorps dilué au 1/300 dans la solution de blocage. L'incubation est poursuivie sur la nuit à 4°C et la révélation suit le même procédé que précédemment, rinçage, incubation avec TSA-FITC et nettoyage. Les tissus sont alors mis à incuber une nuit dans une

solution de PBS contenant du DAPI (32670 sigma à 5 ng/ml) pour permettre une coloration du noyau.

Les tissus peuvent ensuite être observés directement en utilisant un microscope confocal SP8 (Leica). Dans certains cas, les tissus ont été observés à l'aide du microscope confocal SP8 après des coupes successives de 150µm d'épaisseur effectuées par un vibratome couplé au microscope. Les images ont été acquises à l'aide du logiciel Leica LAS AF et analysées à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012).

## **5. Immunocytochimie (ICC)**

Les gonades de poissons-zèbres transgéniques vasa:eGFP sont fixées en paraformaldehyde 4%/PBS et incluses en paraffine. Des sections de 7µm sont montées sur lame pré-coatée avec de la polylysine ( 16002-116,thermo-scientific), puis laissées au moins 1 nuit à 37°C afin de permettre une bonne adhésion des coupes. Les lames sont ensuite réhydratées et déparaffinées en utilisant un automate Mircom HMS 760X. Les lames vont être dans un premier temps chauffées pendant 15min puis elles vont passer successivement dans un bain de toluène (10min), d'alcool 100% (3min), d'alcool 95% (3min), d'alcool 70% (min), eau distillée (5min). Les lames seront récupérées dans l'eau distillée. On réalise ensuite un démasquage des antigènes en incubant les coupes dans du Tampon citrate (pH 6) pendant 15 min à ébullition. Les coupes sont alors rincées au PBS puis incubées 1h dans du PBS contenant 1%BSA et 0.05% Tween20 afin de bloquer des sites aspécifiques. L'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage est déposé sur les coupes et l'incubation est poursuivie sur la nuit dans une chambre humide à 4°C. Une fois l'incubation terminée les lames sont lavées au moins 3 fois dans du PBS puis l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type Alexa est ajouté pendant 1 à 2h à température ambiante. L'ensemble des anticorps utilisés sont regroupés dans le tableau 6. Après 3 lavages successifs de 5 min dans du PBS à température ambiante et un bain d'eau désionisée, des lamelles sont montées en utilisant du Mowiol additionné de Hoescht (0.1µg/ml). Après un séchage de 72h, les coupes ont été observées avec un microscope ECLIPSE 90i équipé de filtres adéquats.

### **5.1. Combinaison ICC/HIT**

L'expression de gènes d'intérêt peut être localisée dans les testicules de poissons-zèbres Dr\_vasa :eGFP en réalisant une HIT suivie d'une ICC pour détecter, respectivement, un transcrit et une protéine d'intérêt. Les ribosondes sont marquées avec de l'UTP-digoxigénine, et l'HIT est réalisée comme décrite précédemment. La ribosonde est révélée en fluorescence. Ensuite, l'échantillon va être rincé en PBS-triton 0.5%, puis sera laissé à imperméabiliser 1h avec cette même solution. Le blocage des sites aspécifiques sera alors réalisé par une incubation de 4h dans une solution de PBS –DMSO 1%-triton 0.1%- sérum de mouton 10%. L'anticorps primaire anti-gfp fait chez le lapin (A11122 life) sera déposé, après dilution au 1/500 dans la solution de blocage. La réaction se fera à 4 degrés sur la nuit. Ensuite, on effectue une série de rinçages au PBS-1%Tween, suivie du blocage des sites aspécifiques pendant 4h à température ambiante. L'anticorps secondaire, l'anti-lapin couplé à l'alexa 488 est alors déposé après dilution au 1/200 dans la solution de blocage. La réaction s'effectue sur la nuit à 4°C. Pour finir les échantillons sont lavés plusieurs fois dans du PBS et pourront ensuite être mis à incuber une nuit dans une solution de PBS contenant du DAPI (32670 sigma à 5 ng/ml) pour permettre une coloration du noyau.

Les tissus peuvent ensuite être observés directement en utilisant un microscope confocal SP8 (Leica). Dans certains cas, les tissus ont été observés à l'aide du microscope confocal SP8 après des coupes successives de 150µm d'épaisseur effectuées par un vibratome couplé au microscope. Les images ont été acquises à l'aide du logiciel Leica LAS AF et analysées à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012). Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont détaillés dans le tableau 6.

## **6. Purifications cellulaires et tri par FACs**

### **6.1. Purification**

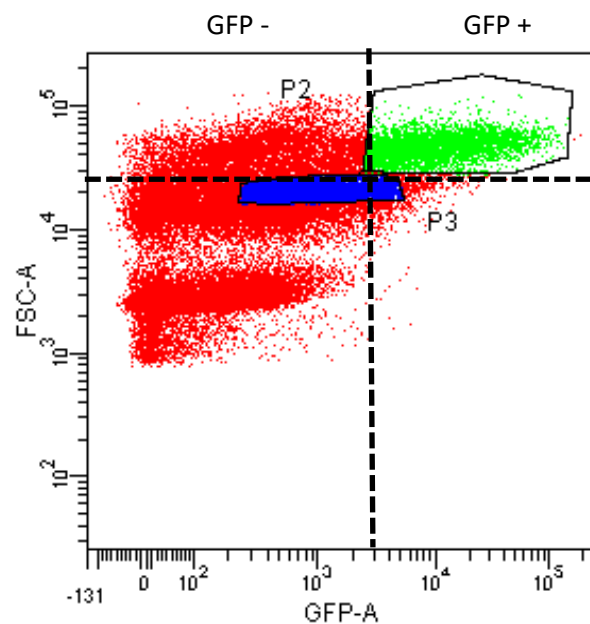
Les testicules sont collectés sur 20 mâles matures âgés de 4 et 6 mois. Durant le temps nécessaire aux prélèvements, les testicules sont maintenus dans une boîte de Pétri de 30 mm de diamètre contenant du milieu de culture L15 à

environ 300 mosm supplémenté avec 2mM de glutamine et les antibiotiques (pénicilline 100unité/ml, streptomycine 100µg/ml). Les testicules sont sectionnés en petits morceaux de 1-2mm avec un petit ciseau et incubés 15 min sous agitation orbitale de 100 rpm pour enlever une partie des spermatozoïdes. Le milieu est retiré et le poids des tissus est déterminé. Les testicules sont ensuite dissociés à 25°C pendant 2h dans 3 ml de L15 contenant 0.2% collagénase (Sigma) et 0.2% dispase (Sigma) sous agitation horizontale de 100 rpm. La dissociation est facilitée par des pipetages répétés toutes les 30 minutes. Les tissus non digérés sont laissés à sédimenter 5min et le surnageant, contenant les cellules dissociées, est collecté dans un tube propre. Le culot est homogénéisé à l'aide de dounce dans 3ml de milieu de dissociation en utilisant des pistons larges et serrés (A puis B). La solution est alors incubée pendant 30min à 25°C et mélangée avec le premier surnageant. Les cellules sont culotées à 100g pendant 10min à 10°C et resuspendues dans 2ml de milieu de culture L15. Les cellules sont chargées sur un coussin de 10ml d'une solution de percoll à 45% dans du L15 ajusté à 300mOsmol/kg et centrifugées pendant 50min à 500g à 10°C pour culotter les cellules sanguines et les spermatozoïdes. Les cellules dissociées d'intérêt, formant un anneau dans la partie supérieure du surnageant, sont récupérées et diluées dans 5ml de milieu L15 supplémentés. Un comptage des cellules totales (hors spermatides et spermatozoïdes) et fluorescentes est réalisé en cellule de Thomas avec du bleu trypan à 4% (Sigma) dilué au 1:2. En moyenne pour une centaine de poissons, on récupère 500mg de tissus et environ 150.000.000 cellules après l'étape du coussin de percoll.

## **6.2. Pré-enrichissement des fractions cellulaires à trier (plating)**

La solution cellulaire est déposée sur une boîte de Pétri pré-coatée avec une solution de gélatine 1% (sigma G9391) et laissée au repos sur la nuit pour permettre l'adhésion préférentielle des cellules somatiques et des spermatogonies. Le surnageant est prélevé et les cellules adhérentes sont lavées plusieurs fois au PBS. À chaque rinçage le PBS utilisé est poolé avec le surnageant préalablement prélevé, puisqu'il contient des cellules surnageantes. Finalement, par rapport aux cellules totales après coussin de percoll, on récupère des cellules dites adhérentes (environ 8% des cellules totales), des cellules dites surnageantes (environ 64% de cellules





Tube: adherentes			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	67,816	###	100.0
P1	60,494	89.2	89.2
Fraction GFP+ : P2	4,363	7.2	6.4
Fraction GFP- : P3	5,561	9.2	8.2

**Figure 33 : Profil utilisé pour le triés de cellules de la lignée vasa:eGFPto2.L**

Les cellules sont visualisées en fonction de leur taille (FSC-A) et de l'intensité de leur fluorescence (GFP-A). Ceci à permis de définir 3 populations. La population P1 (rouge) exclut les populations de trop petites tailles (débris cellulaires ou spermatozoïdes résiduels ). La population P2 (verte) correspond aux évènements ayant une taille et une intensité de fluorescence importante. La fraction P3 (Bleu) ne présente pas de fluorescence.

totales), et on perd environ 28% de cellules. Les cellules surnageantes sont gardées de côté et les cellules adhérentes sont lavées plusieurs fois avec du PBS avant d'être traitées avec un mélange Trypsine/EDTA pendant environ 10min à 27°C. La digestion est stoppée par dilution dans le milieu L15. Les cellules sont alors centrifugées 10 minutes à 100g puis resuspendues dans du PBS pour obtenir une concentration d'environ 20 millions de cellules par ml.

### **6.3. Tri cellulaire**

#### **6.3.1. Mise au point.**

Avant de procéder au tri, un certain nombre de mises au point ont été réalisées. La suspension cellulaire est filtrée à 70µm puis analysée par le cytomètre. Dans un premier temps, il est nécessaire de passer un échantillon cellulaire provenant de testicules d'animaux non transgéniques, afin de déterminer le seuil d'auto-fluorescence et le patron de répartition des différentes populations cellulaires présentes dans les testicules. Ceci nous a permis, par l'analyse de la taille (FSC) et de la granularité des cellules (SSC) de définir une première fenêtre (population P1) qui excluait les populations de trop petite taille, correspondant à des débris cellulaires ou des spermatozoïdes résiduels (50 à 70% des évènements visualisés). Nous avons ensuite passé nos échantillons fluorescents afin de déterminer la proportion de cellules fluorescentes présentes dans la population P1. Comme nous voulions récupérer les cellules les plus fluorescentes et avec une taille importante nous avons sélectionné une population (P2) ayant une intensité de fluorescence supérieure à  $10^3$  et d'une taille (FSC-A) supérieure à  $10^4$ . Une fraction présentant une faible fluorescence est aussi prélevée (P3) pour servir de contrôle négatif (figure 33)

#### **6.3.2. Tris sur fluorescence.**

Une fois les mises au point réalisées, la suspension cellulaire a pu être filtrée à 70µm et triée par un trieur de cellules Becton Dickenson FACS Aria II (BD sciences). Les cellules GFP positives (7-8% de P1) sont triées à la vitesse de 5000 évènements par seconde à travers une buse de 100µm et recueillies dans du PBS maintenu sur

glace. Les cellules triées sont ensuite culotées par centrifugation (100g, 5minutes, 10°C) et leurs ARN totaux sont extraits immédiatement en utilisant le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen ref 74104)

Dans nos conditions d'expérimentation, 75 poissons âgés d'environ 5 mois permettent d'obtenir environ 500 mg de poids frais de testicules et environ 1 million de cellules fluorescentes. Le rendement de l'extraction des ARN totaux a été jugé satisfaisant avec 1,5 µg d'ARN total.

## **7. Evaluation des propriétés souches des cellules germinales fluorescentes.**

### **7.1. Transplantation**

Les cellules triées sont resuspendues dans du milieu L15 complété avec 0.04% de bleu trypan pour obtenir une suspension contenant 20 000 cellules/µl. Un capillaire de borosilicate est rempli avec la solution cellulaire (1.0mm OD x 0.5mm ID, GC100FS-10, Harvard apparatus, UK) et utilisé pour injecter les cellules triées dans la cavité abdominale de poissons-zèbres âgés de 16 jours. Nous avons utilisé comme animaux receveurs des animaux mutants récessifs présentant une robe dorée dépourvue de mélanocytes et exprimant une protéine fluorescente rouge dans les gonades. Les animaux porteurs de cette mutation ont été sélectionnés initialement à partir de la lignée tg117 (Fan et al., 2008) qui nous a été procurée par le Dr Collodi, Université de Perdue, USA. Afin d'observer la colonisation de la gonade fluorescente en rouge des animaux receveurs par les cellules fluorescentes vertes purifiées nous avons utilisé un microscope AZ100 (Nikon Instruments) équipé avec des filtres Texas Red (604/644nm) et GFP (500-550nm).

Pour évaluer la fonctionnalité des gamètes issus des cellules germinales triées et transplantées, trois mâles et trois femelles présentant une forte fluorescence verte au niveau de la gonade ont été reproduits par couple avec des animaux mutants dorés non transplantés et de sexe opposé. Cette expérimentation a reçu l'accord du comité d'éthique local (CREEA) sous le numéro de dossier 2016043004103873.

## **7.2. Traitement des poissons au busulfan**

Les poissons-zèbres de la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2, âgés de 3 à 6 mois, ont été acclimatés à 35°C pendant 7 à 12 jours avant de recevoir 2 injections successives de 20 µl de busulfan (20 mg/ml de DMSO 50%/PBS 50%) et espacées de 7 jours. Des animaux non injectés ont également été maintenus à 35°C pendant 14 jours après la période d'acclimatation. Cette expérimentation a reçu l'accord des comités d'éthiques locales et ministérielles sous le numéro d'autorisation 00389.03.

## **8. Production et traitement des données de Rnaseq**

### **8.1. Extraction des ARNs totaux et séquençage à ultra haut débit**

Les ARNs issus des différentes fractions d'intérêt sont extraits avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen ref 74104). Le séquençage de 8 échantillons (15µl contenant chacun environ 250 ng d'ARNs) a été réalisé sur la Plateforme Biopuces et Séquençage de l'IGBMC (Illkirch, France) (Tableau 7). Brièvement, les ARNs totaux ont été traités en suivant le protocole de séquençage haut-débit Illumina ribozero en brin orienté de 2x50 pb. Ce dernier permet d'éliminer spécifiquement les ARNs ribosomiaux de la totalité des ARNs extraits. En moyenne, 80 millions de lectures appariées (ou « paired-end reads » en anglais, correspondant aux deux séquences nucléotidiques de 50 pb pour chaque fragment d'ARN) ont été séquencées par échantillon (figure 34 ; Tableau 7).

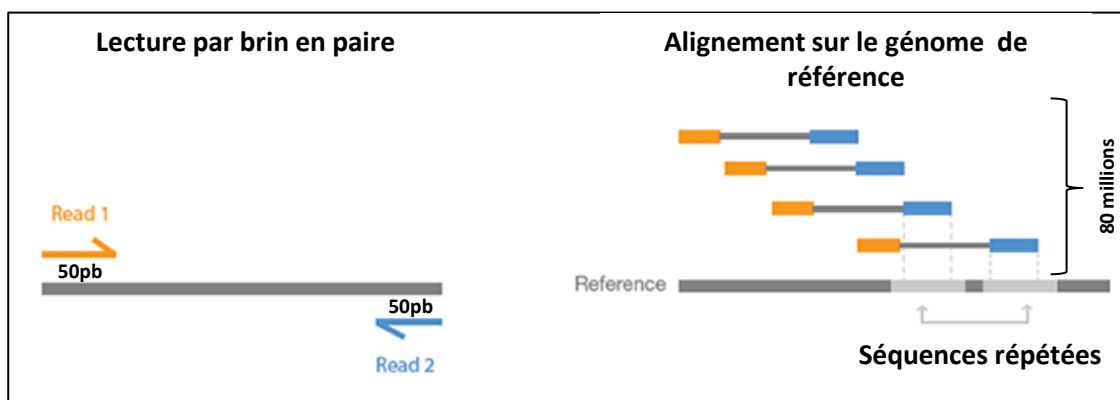
### **8.2. Prétraitement des données de RNA-seq**

Le prétraitement des données inclut plusieurs étapes permettant d'aboutir à une quantification des transcrits exprimés dans les différents échantillons analysés. Ces étapes sont décrites dans les prochaines sections et se basent principalement sur l'utilisation de la suite de programme Tuxedo développée par le laboratoire de Cole Trapnell (Trapnell et al., 2012).

### **8.3. Alignement des lectures sur le génome de référence**

Fractions d'intérêts	Nom des échantillons	Nombre de reads
Lignée vasa :eGFP	Zf SPG1	82,789,990
	Zf SPG2	81,406,404
Lignée gsdf :eGFP	Zf SE1	72,650,030
	Zf SE2	79,182,134
Fraction non triée	Zf NT1	81,229,592
	Zf NT2	75,626,636
Fraction testiculaire traité au morpholino	Zf MO1	66,251,924
Fraction testiculaire totale	Zf WT1	84,745,914

**Tableau 7 : Nombre de lecture (read) par échantillons lors du séquençage Haut débit de type Rnaseq (Illumina 4000).**



**Figure 34 : Principe du Sequencage en « paired-end ».**

Les deux séquences de 50pb vont servir d'amorces pour générer de nombreuses séquences (environ 80 millions). La distance séparant chaque amorce étant connue, un algorithme peut être utilisé pour permettre un meilleur alignement des séquences sur le génome de référence.

Adapté du site illumina : [http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/paired-end-sequencing\\_assay.html](http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/paired-end-sequencing_assay.html)

Afin d'associer chaque lecture appariée à un gène/transcrit, il convient tout d'abord d'aligner ces séquences sur un génome de référence à l'aide d'un outil de « *mapping* ». Dans le cas présent, nous avons utilisé le logiciel TopHat (version 2.0.12) (Kim and Salzberg, 2011; Kim et al., 2013; Trapnell et al., 2009) sur la version 10 de la séquence génomique de *Danio rerio* (danRer10) disponible sur le site internet de l'Université de Santa-Cruz (UCSC) (Howe et al., 2013). L'objectif de cette étape est d'aligner le plus grand nombre de lectures. Pour cela, nous nous sommes basés sur les préconisations décrites dans plusieurs articles publiés (Chalmel et al., 2012; Pauli et al., 2012; Zimmermann et al., 2015). Brièvement, afin d'identifier/d'aligner un maximum de lectures correspondant à des jonctions exoniques (chevauchant deux exons) : les coordonnées génomiques de l'ensemble des jonctions exoniques connues (mRNAs et Expressed Sequence Tags ou ESTs) sont fournies à TopHat afin de lui faciliter la tâche ; deux étapes successives de « *mapping* » sont réalisées.

### **8.3.1. Assemblage et quantification**

Une fois les lectures appariées alignées sur le génome, la Tuxedo suite utilise séquentiellement 4 outils (Trapnell et al., 2010) permettant de :

- assembler les différents transcrits présents dans chaque échantillon indépendamment (programme cufflinks, version 2.2.1) ;
- recenser l'ensemble des transcrits dans l'ensemble des échantillons en supprimant les redondances (cuffmerge) ;
- quantifier les transcrits non-redondants obtenus dans chaque échantillon individuel (cuffquant) ;
- normaliser l'ensemble de ces données d'expression afin de permettre la comparaison inter-échantillon (cuffnorm) ;
- enfin, associer/annoter les transcrits assemblés avec les gènes/transcrits connus présents dans les banques Ensembl et RefSeq (versions disponibles en date du 21 septembre 2015) (Aken et al., 2016; O'Leary et al., 2016).

### **8.3.2. Raffinement et nettoyage des transcrits assemblés**

Ces différentes étapes de prétraitement des données de séquençage conduisent à une grande quantité d'artefacts et à des événements transcriptionnels inintéressants (pre-mRNA par exemple). Il convient généralement d'appliquer une dernière étape de raffinement afin de ne sélectionner que les transcrits les plus pertinents. Pour cela, nous utilisons trois critères afin de sélectionner les transcrits :

- de plus de 200 nucléotides, le protocole de RNA-seq utilisé étant dédié aux longs ARNs ;
- de plus de 2 exons ;
- exprimés dans au moins une condition expérimentale au-dessus de 3 FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped : Fragment par kilobase d'exon par millions de fragments mappés)

### **8.4. Filtration statistique des transcrits différentiellement exprimés**

Les transcrits présentant un différentiel d'expression significatif entre les cellules de Sertoli et les spermatogonies ont été sélectionnés en appliquant trois critères :

- expression > 3 FPKM dans au moins un des deux types cellulaires afin de sélectionner les transcrits détectables ;
- fold-change > 2 afin de sélectionner les transcrits affichant des ratios les plus différentiels entre les deux types cellulaires ;
- p-value ajustée (FDR) < 0,05 afin de ne conserver que les transcrits significativement différentiellement exprimés.

Les transcrits passant successivement tous ces critères de sélection constituent notre ensemble d'évènements différentiellement exprimés entre les deux types cellulaires d'intérêt. Ces derniers sont classés en deux groupes (ou « cluster ») :

- un groupe de transcrits présentant une expression significativement plus élevée dans les cellules de Sertoli par rapport aux spermatogonies
- un deuxième groupe présentant une expression significativement moins élevée dans les cellules de Sertoli par rapport aux spermatogonies

## **9. Analyse de l'histoire évolutive de gènes d'intérêt**

### **9.1. Analyses phylogénétiques**

La séquence des protéines déduites des ADNc reconstitués par l'assemblage des lectures de RNAseq a été alignée sur le génome du poisson-zèbre (zv10) de la base de données Ensembl pour valider la séquence protéique du poisson-zèbre et identifier les séquences paralogues chez cette espèce et les orthologues potentiels chez d'autres espèces représentant des taxons bien distincts sur l'arbre de la vie (mammifère, oiseaux, poissons-téléostéens, poissons osseux non téléostéens, poissons cartilagineux, poissons sans mâchoires...). La protéine de poisson-zèbre a également été utilisée avec l'algorithme tblastn pour interroger des bases de données de séquences nucléiques (génome, ADNc ou EST) déposées au NCBI. L'ensemble des séquences protéiques recueillies ont été compilées dans le logiciel BioEdit. Le module bioinformatique ClustalW a été utilisé pour aligner des séquences protéiques similaires. Le fichier d'alignement a ensuite été analysé à l'aide du logiciel MEGA7 pour réaliser une reconstruction phylogénétique par différentes méthodes incluant celles du plus prochain voisin (NJ) ou du maximum de vraisemblance (ML). La robustesse des nœuds a été analysée statistiquement par la méthode des bootstrap.

### **9.2. Analyse de synténies**

La relation d'orthologie mise en évidence par la reconstruction phylogénétique a été consolidée par une analyse des régions chromosomiques adjacentes au gène étudié chez plusieurs espèces. Cette étude qui permet de vérifier si l'environnement génique est conservé d'une espèce à l'autre ou d'un taxon à l'autre a été réalisée grâce à l'outil en ligne Genomicus (<http://www.genomicus.biologie.ens.fr/genomicus-84.01/cgi-bin/search.pl>) décrit récemment (Muffato et al., 2010). Dans certains cas, l'analyse a été complétée par des interrogations de séquence sur la base de données des génomes d'ENSEMBL.

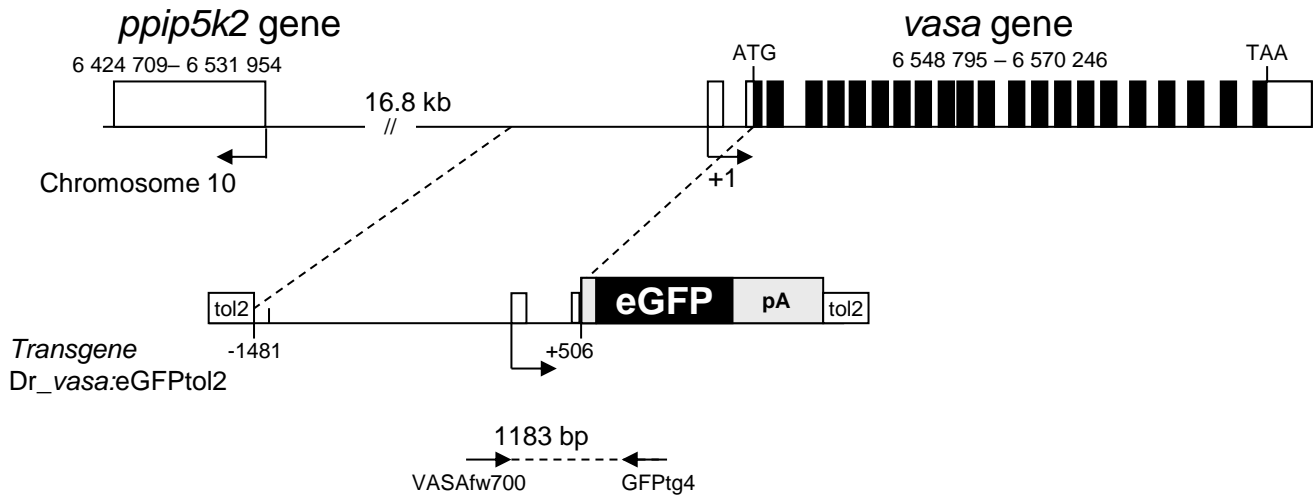




# **RESULTATS**

---

**Partie 1 : Caractérisation d'une sous-population de spermatogonies indifférenciées chez le poisson-zèbre**



**Figure 35: Représentation schématique de la structure du gène *vasa*, et du transgène *Dr\_vasa:eGFPtol2*.**

Le gène *vasa* est situé au niveau du chromosome 10. Le gène *ppi5k2* codant pour la diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 2 est présent 16.8kb en amont du gène *vasa* mais dans le sens inverse. Dans le transgène, un fragment du promoteur *vasa* est placé en amont du cadre de lecture ouvert de la GFP. Le fragment de promoteur est constitué de 1,5kb de la région proximale du promoteur (en amont du site potentiel d'initiation de transcription) et de 0,4kb de la région intragénique (avant le codon d'initiation ATG). Cette région intragénique correspond au premier exon non codant, au premier intron et au 27 premières bases du second exon. Le gène chimérique est entouré de deux motifs *tol2* qui sont nécessaires à la liaison de la transposase *tol2* et de l'excision du transgène. Le plasmide *Dr\_vasa:eGFPtol2* est co-injecté avec l'ARNm de la transposase dans des embryons de zebrafish au stade une cellule. Les poissons transgéniques sont identifiés par génotypage individuel sur des échantillons de nageoire à l'aide des amorces VASAw700 et GFPtg4

# **1. Caractérisation des cellules de la lignée transgénique Dr vasa :eGFPtol2.**

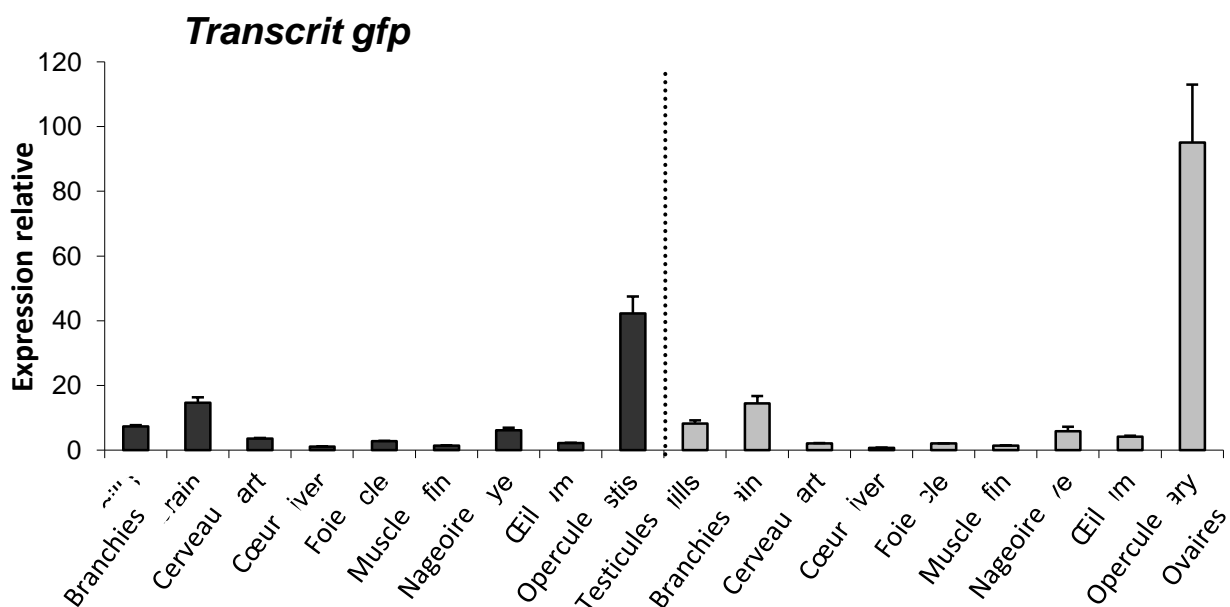
## **1.1. Production de la lignée transgénique Dr vasa:eGFPtol2.**

Comme mentionné en introduction, une étude précédente réalisée chez le poisson-zèbre avait montré qu'une partie du promoteur du gène *vasa* fusionnée aux régions intra géniques et 3'UTR, était capable d'entraîner une expression du transgène dans les PGC en migration et dans les gonocytes colonisant la gonade lorsque le transgène était transmis par voie maternelle (Krøvel and Olsen, 2002). En revanche, l'expression de ce transgène chez les mâles adultes était limitée aux spermatogonies A et B, que le transgène soit transmis par la mère ou par le père. Cette observation suggérait que la région 3' UTR n'était pas responsable de la spécificité cellulaire de l'expression du transgène chez l'animal adulte. Pour tester cette hypothèse, nous avons produit un nouveau transgène dépourvu de la région 3' UTR du gène *vasa*. Un fragment promoteur (-1481/+506) de ce gène a été placé en amont du cadre ouvert de lecture codant pour la protéine reportrice GFP et de la région 3'UTR du transcrite codant pour l'antigène T du virus SV40 pour former un gène chimérique fonctionnel (figure 35). Il est important de noter que le fragment promoteur utilisé contenait 1.5 kb en amont du site d'initiation de la transcription, 200 pb du premier exon non traduit, 150 pb du premier intron, et 24 pb du second exon dont les deux dernières bases correspondaient aux deux premières bases du codon initiateur de la traduction.

L'utilisation de la technique de transgénèse additive médiée par la transposase Tol2 avait permis la production des premières lignées appelées C3, C14 et C18 dans le cadre de la thèse d'Aude Gautier. Malheureusement, deux de ces lignées (C18 et C14) ont été perdues à la suite d'incidents d'élevage sans que le patron d'expression du transgène puisse être clairement établi chez le mâle. Au cours de ma thèse, 6 autres animaux « fondateurs » (C1, C2, C4, C5, C6 et C7) exprimant la GFP avec une intensité de fluorescence variable au niveau de l'abdomen ont été générés. Chaque fondateur a été reproduit avec des poissons sauvages du sexe opposé pour générer une descendance F1. Le pourcentage des poissons transgéniques dans la génération F1 a été très variable en fonction des fondateurs (2 à 20 %) probablement

Lignée	Parent	Effectif de la descendance * (F2)	% d'embryons fluorescents	Nombre potentiel de site d'insertion**
C1	F1	124	87,9	>3
C2	F1	91	97,8	>3
C3	F1	200	53,5	1
C4	F1	114	78,1	2
C5	F1	178	48,9	1
C6	F1	184	42,4	1
C7	F1	142	44,7	1

**Tableau 8 : Taux de transmission du transgène dans les différentes lignées de poissons-zèbre transgéniques.** \* Un animal F1 de chaque lignée a été reproduit avec des poissons sauvages. Le taux de transmission du transgène aux descendants F2 a été évalué 45 jours après fécondation. \*\* Le nombre de sites d'insertion potentiels est déterminé selon les lois de ségrégation Mendélienne.



**Figure 36: Le transgène est exprimé spécifiquement dans la gonade des poissons-zèbre transgéniques.**

Le patron d'expression du transcrit du transgène *Dr\_vasa:eGFPtol2* est analysé par qPCR sur des individus de la lignée C3. L'expression relative est normalisée par l'ARN 18s. La distribution du transcrit gfp est bien retrouvée principalement exprimée dans les gonades, avec une expression plus forte dans l'ovaire

en raison d'un mosaïcisme dépendant de la cinétique d'insertion du transgène au cours du développement précoce.

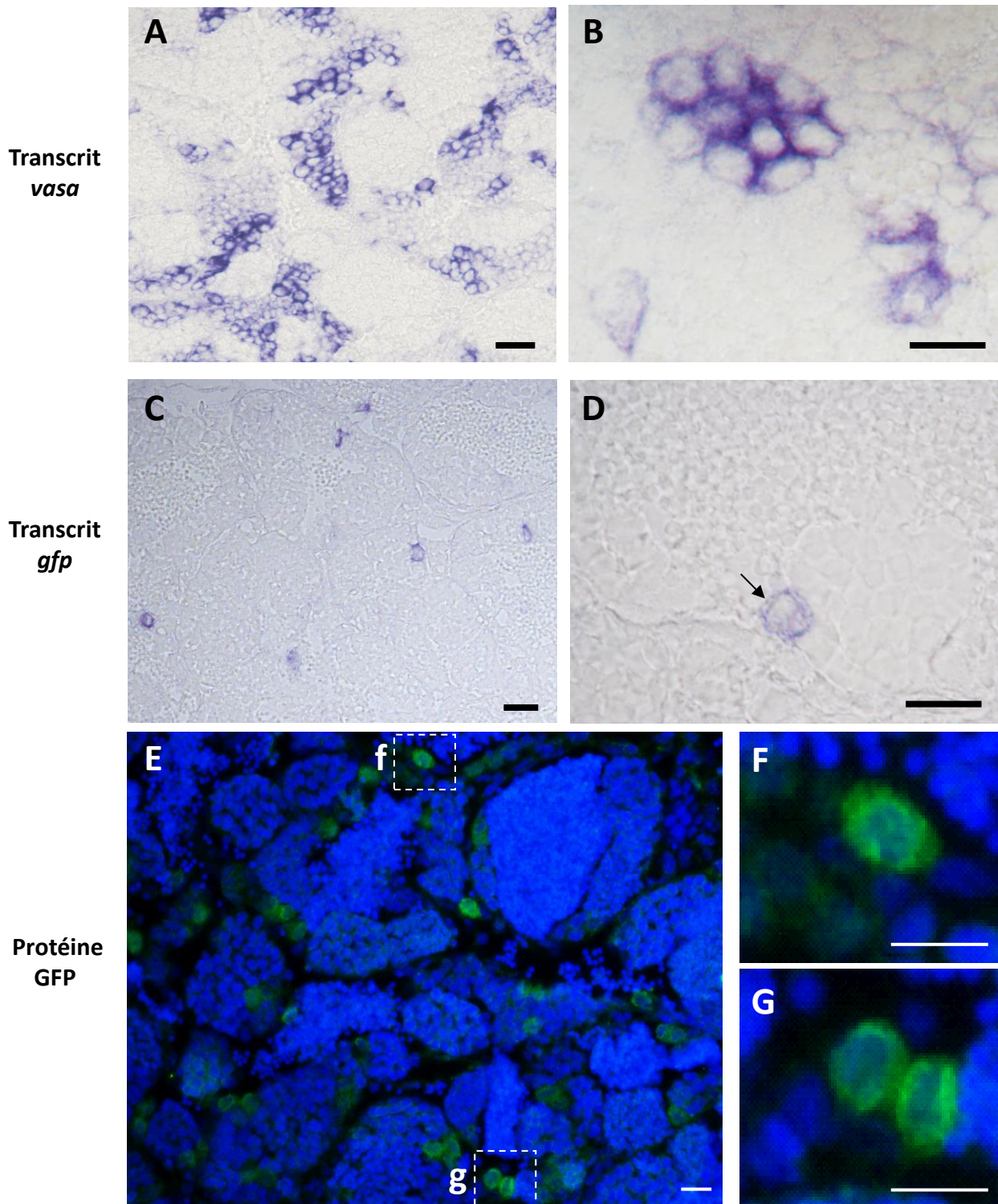
Afin de générer des lignées indépendantes et d'estimer le nombre de sites d'insertion du transgène, un seul animal F1 a été reproduit avec des poissons sauvages. Le taux de transmission du transgène aux descendants F2 a été évalué en comptant le nombre d'alevins fluorescents à 45 jours (tableau 8). Seuls les individus F1 des lignées C3, C5, C6, et C7 ont montré un taux de transmission proche de 50 % en accord avec la loi de ségrégation mendélienne pour un site d'insertion unique. Les lignées C1 et C2 ont montré un très fort taux de transmission du transgène à la descendance (entre 85 et 98 %) suggérant la présence de multiples sites d'insertion chez les individus F1 testés ( $n > 3$ ). Toutes les lignées transgéniques indépendantes produites ont montré une intensité de fluorescence maximale dans la gonade. Cette observation démontre que la spécificité tissulaire relative de l'expression du transgène est indépendante de la nature du site d'insertion.

Bien que la lignée C2 présente une intensité de fluorescence très forte au niveau de la gonade et même en dehors de celle-ci, les intensités de fluorescence observées dans les différentes lignées n'étaient pas clairement liées au nombre de sites d'insertion. En effet, bien que la lignée C1 présente de multiples sites d'insertion, l'intensité de fluorescence observée dans cette lignée était nettement inférieure à celle observée dans les lignées C3, C4, C5, et C6. De même, la lignée C7 présentait une fluorescence bien plus faible que les autres lignées C3, C5 et C6 alors que ces quatre lignées présentaient un site d'insertion unique. Cette dernière observation montre en revanche que le niveau d'expression du transgène est influencé par le site d'insertion.

En résumé, l'ensemble des observations réalisées sur les différentes lignées transgéniques démontre que le fragment -1481/+506 du gène *vasa* porte toute l'information nécessaire pour cibler l'expression d'un transgène dans la gonade.

### **1.2. Le transgène s'exprime dans des doublets asymétriques de spermatogonies A**

Les observations macroscopiques réalisées sur toutes les lignées transgéniques générées ont montré que la fluorescence spécifique de la GFP était



**Figure 37: Patron d'expression du transgène Dr *vasa:eGFPtol2* chez le poisson-zèbre mâle.**

La localisation cellulaire des transcrits *vasa* et *gfp* a été analysé dans les testicules de males sexuellement matures par technique d'hybridation des ARNm sur tissus entiers. Des sondes couplées à la digoxygénine sont détectées par réaction chromogénique médiée par le NBT/BCIP. Le transcrit *vasa* est détecté dans le cytoplasme de spermatogonie (A,B). Le marquage est retrouvé dans des cellules isolées (13-15 $\mu$ m), des cellules en paire (11-14 $\mu$ m) et des groupes de 4 à 32 spermatogonies. De son côté, le transcrit *gfp* est lui retrouvé uniquement dans de grandes cellules isolées (13-15 $\mu$ m) (C,D). L'analyse du patron d'expression de la protéine (E,F,G) montre une accumulation de la protéine dans des cellules isolées (F) mais aussi dans des cellules en paires (G). Barre d'échelle : 20 $\mu$ m

principalement localisée dans les gonades mâles et femelles. L'analyse de la distribution tissulaire de l'ARNm de la GFP, réalisée par qPCR sur différents tissus de la lignée C3, confirme l'expression préférentielle du gène rapporteur au sein de la gonade (figure 36). Chez le mâle, les observations macroscopiques de la fluorescence au niveau des testicules montrent un patron en damier, avec des points de fluorescence intense (10 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre) à l'intérieur des tubules séminifères, mais distribués de manière aléatoire dans le testicule. Dans l'ovaire, une très haute intensité de fluorescence a été observée dans les ovocytes primaires (15 à 50  $\mu\text{m}$ ) principalement localisés à la périphérie du tissu ou entre les ovocytes en phase finale de maturation.

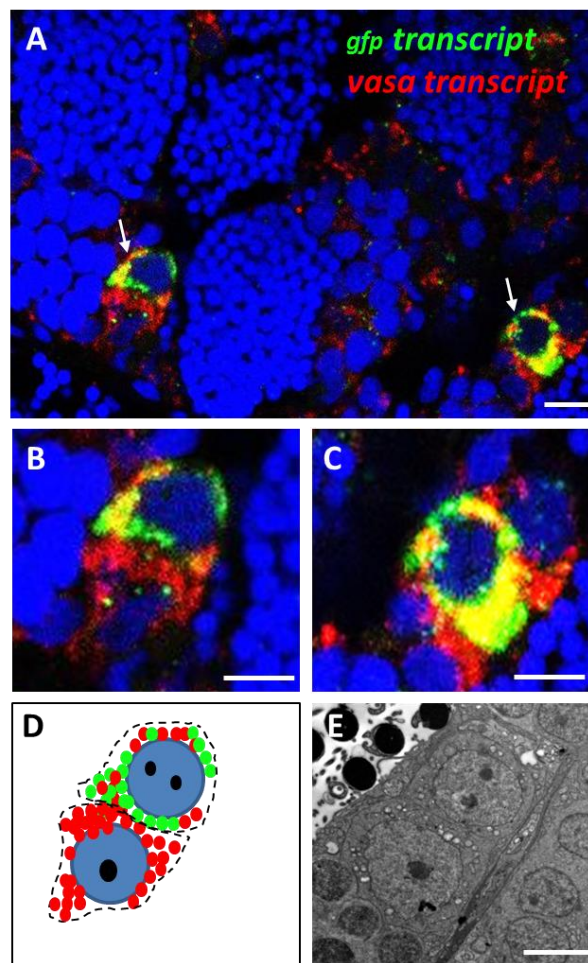
L'analyse comparée des patrons d'expression cellulaires des transcrits *gfp* et *vasa* endogènes a d'abord été réalisée sur des gonades de poisson-zèbre de la lignée transgénique C3. Chez le mâle, l'expression des transcrits est visualisée par hybridation *in toto* des ARNm de la gonade entière (figure 37). Le transcrit du gène *vasa* endogène est observé dans le cytoplasme de spermatogonies isolées de type As (12-14  $\mu\text{m}$  de diamètre) et dans des groupes de 2 (spermatogonies A en paires) à 64 spermatogonies (12-9  $\mu\text{m}$  de diamètre). L'intensité du marquage semble décroître dans les spermatogonies B (9  $\mu\text{m}$ ) en comparaison des spermatogonies isolées As et en paires (Ap). De son côté, le profil d'expression du transcrit *gfp* apparaît bien plus restreint puisque ce dernier n'est retrouvé que dans le cytoplasme de quelques spermatogonies de grandes tailles (10-12  $\mu\text{m}$ ), apparemment isolées et proche de la membrane basale du tube séminifère. L'expression de la protéine GFP dans des cellules isolées a pu être confirmée par immunocytochimie (figure 37). Cependant, cette technique révéla aussi une expression de la protéine dans plusieurs doublets de spermatogonies indifférenciées. Le marquage fut aussi observé beaucoup plus sporadiquement dans de rares groupes de 3 ou 4 spermatogonies (10 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre) apparemment alignées et à la base du tube séminifère. Le patron d'expression cellulaire de la GFP est conservé entre les lignées transgéniques C3 et C5 indiquant que le fragment de promoteur du gène *vasa* contient bien toute l'information nécessaire pour une expression cellulaire spécifique du transgène dans les spermatogonies.

L'utilisation d'un microscope confocal a permis la visualisation en trois dimensions de la fluorescence native sur des sections épaisses de testicules brièvement fixés. La fluorescence native a été observée principalement dans les



	Types cellulaires	Diamètre nucléaire de la cellule (µm)	Diamètre cellulaire (µm)	Nombre de types cellulaires	Nombre de cellules	% de spermatogonies A	% de cellules fluorescentes
Spermatogonies indifférenciées fluorescentes	Seule	9 ± 0.3	13	9	9	3.7	4.0
	En paire	9 ± 0.5	13	93	186	75.6	83.4
	Chaines ou groupement	8.5 ± 0.3	12	7	28	11.4	12.6
Spermatogonies indifférenciées non-fluorescentes	Seule	9 ± 0.3	13	3	3	1.2	
	En paire	9 ± 0.5	13	6	12	4.9	
	Chaines ou groupement	8.5 ± 0.3	12	2	8	3.3	

**Tableau 9 : Bilan de la répartition des différents types de spermatogonies A exprimant ou non la protéine GFP au sein du testicule.**



**Figure 38: Expression du transcrit *gfp* au sein de doublets asymétriques de spermatogonies A.**

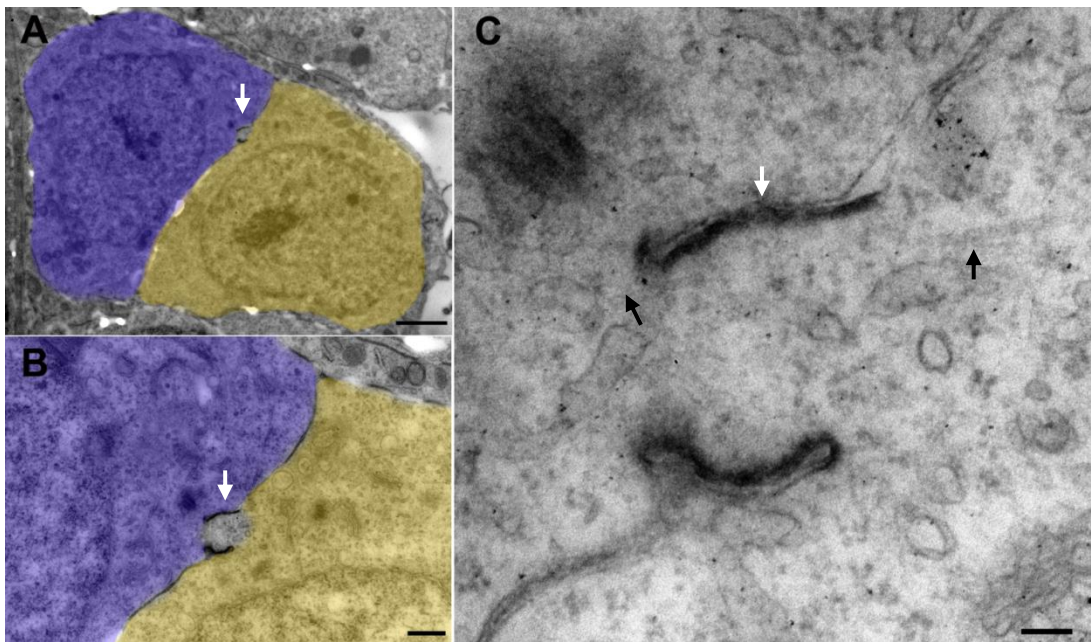
Les transcrits *gfp* et *vasa* sont détectés par la technique de double hybridation fluorescente sur tissus entiers (A, B, C). Les sondes *gfp* et *vasa* sont révélées, respectivement, par le Cy3 (Rouge) et la FITC (Verte). Les images ont été prises à l'aide d'un microscope confocal sur des sections tissulaires de 100µm d'épaisseur. Les signaux sont acquis séparément puis les deux images sont superposées. Les deux transcrits *gfp* et *vasa* sont colocalisés dans une seule des deux cellules formant un doublet de spermatogonies (flèche blanche). Les images B et C correspondent à un grossissement des doublets concernés. En D, l'illustration représente une interprétation schématique des doublets. En E, image acquise par microscopie électronique à transmission des doublets asymétriques de spermatogonies A.

Bar d'échelle : 10µm.

spermatogonies indifférenciées en paires et plus rarement dans des spermatogonies isolées ou alignées en chaînes. Un comptage cellulaire a montré que 83 % des spermatogonies fluorescentes étaient en doublets, 4 % étaient isolées et 13 % formaient des alignements de 4 cellules (tableau 9). Dans de nombreux cas, deux cellules fluorescentes isolées ont été observées proches l'une de l'autre. La distance, séparant les deux cellules isolées, était variable et pouvait aller de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres avec l'insertion d'un cyste de cellules germinales plus différenciées séparant les deux cellules fluorescentes. Des spermatogonies indifférenciées isolées, en paires ou en chaînes, ne présentant pas de fluorescence ont également pu être observées malgré leur rareté (tableau 9).

Afin de comprendre l'apparente contradiction existante entre le patron d'expression du transcrite *gfp* (cellules seules) et celui de la protéine GFP correspondante (cellules seules et en paires), nous avons réalisé une double hybridation *in toto* avec des ribosondes dirigées spécifiquement contre les transcrits *gfp* et *vasa*. L'observation des signaux respectifs par microscopie confocale révéla que le transcrite *gfp* était principalement accumulé dans une seule des deux cellules formant un doublet de spermatogonies (figure 38). Le noyau des cellules qui expriment le transcrite *gfp* montre un nucléole généralement plus fragmenté, alors que le nucléole de l'autre cellule contiguë reste non fragmenté. En conséquence, il apparaît que l'expression du transcrite *gfp* se met en place dans des doublets de spermatogonies présentant également des caractéristiques structurales asymétriques, qui signe un début de différenciation de la cellule. L'observation par microscopie électronique à transmission du tissu testiculaire met en évidence la présence d'un pont intercellulaire entre les cellules des doublets de spermatogonies A morphologiquement asymétriques (figure 39). Il est bien admis que ces ponts qui se forment à la suite d'une cytokinèse incomplète permettent le passage de matériels cytoplasmiques d'une cellule à l'autre. Ainsi, il est probable que la protéine GFP produite initialement dans une seule cellule peut diffuser dans la deuxième cellule en passant par ce type de pont intercellulaire.

Dans toutes les lignées Dr\_vasa:eGFPtol2, le transgène *gfp* n'est pas exprimé avant l'âge de 19-21 jpf (jour post-fécondation) ce qui indique que la protéine GFP n'est pas accumulée dans les PGCs ou dans les gonocytes indifférenciés des animaux pré-pubères. Ceci est vrai quel que soit le type de transmission, maternelle ou paternelle, du transgène. L'apparition des doublets de spermatogonies



**Figure 39: Présence de pont intercellulaire entre les deux cellules des doublets de spermatogonies A.**

(A, B, C) L'observation de testicules entiers de zebrafish par microscopie électronique à transmission a permis de mettre en évidence la présence d'un pont intercellulaire entre les deux cellules d'un doublet de spermatogonies A (Flèches blanches). (C) A plus fort grossissement, aperçoit que les microtubules passent d'une cellule à l'autre (Flèches noires).

fluorescentes est visiblement un processus tardif observé uniquement lorsque la différenciation testiculaire et la spermatogenèse sont initiées chez le mâle. Cette particularité est également observée avec les spermatogonies  $A_{pr}$  décrites chez les mammifères après la naissance. Ainsi, il est probable que le transcrit *gfp* soit d'abord exprimé dans les doublets asymétriques de spermatogonies A en paires, qui apparaissent au moment de l'initiation de la spermatogenèse (puberté) chez les poissons zèbres mâles.

Afin de pouvoir caractériser cette population de cellules  $A_{pr}$  d'un point de vue moléculaire et fonctionnel, nous avons mis au point une technique permettant la purification des cellules spermatogoniales fluorescentes à partir de la lignée C3 Dr\_vasa :eGFPtol2.

### **1.3. Caractérisation moléculaire des spermatogonies exprimant la GFP.**

Dans le but de caractériser les spermatogonies exprimant le transgène *gfp* nous avons pensé à mettre en œuvre deux stratégies différentes pour étudier leur signature moléculaire. La première démarche expérimentale a été une approche *in situ* basée sur les techniques de double marquage d'ARNm et/ou de protéines. La deuxième démarche a été basée sur une approche *ex vivo* par qPCR après purification des cellules fluorescentes. Ces deux approches nécessitaient de disposer de marqueurs cellulaires fiables des différentes cellules testiculaires.

#### **1.3.1. Recherche de marqueurs pour les différents types cellulaires de la gonade mâle**

##### **1.3.1.1. Recherche de marqueurs potentiels par immunohistochimie à l'aide d'anticorps hétérologues**

Nous avons testé, sur des coupes testiculaires, des anticorps hétérologues correspondant à des marqueurs de SSC précédemment décrits chez d'autres espèces, incluant les mammifères, les poissons et les oiseaux. Nous avons en particulier testé deux anticorps dirigés contre deux épitopes différents de la protéine NANOS2 de souris, mais aucun marquage spécifique n'a pu être obtenu sur des coupes de paraffines de testicules adultes de poisson-zèbre alors que les coupes de testicules de rats montraient un marquage spécifique. L'un de ces

PGC	Spermatogonies A/SSC	Spermatogonies B	Spermatocytes	Spermatogonies	Sertoli	Leydig	interstitiel
<i>dnd</i>	<i>cd9a</i>	<i>kita</i>	<i>sycp1</i>	<i>dazl</i>	<i>amh</i>	<i>cyp17a</i>	<i>esama</i>
<i>gcl</i>	<i>cd9b</i>	<i>kitb</i>		<i>vasa</i>	<i>amhr</i>	<i>cyp17b</i>	<i>fli</i>
	<i>csfr1a</i>	<i>ly75</i>			<i>fshr</i>	<i>insl3</i>	
	<i>csfr1b</i>	<i>tuba</i>			<i>gsdf</i>		
	<i>etv5a</i>						
	<i>etv5b</i>						
	<i>gfra1a</i>						
	<i>gfra1b</i>						
	<i>gtsf1</i>						
	<i>hmgb2a</i>						
	<i>hmgb2b</i>						
	<i>hmgb3</i>						
	<i>id4</i>						
	<i>lhcgr</i>						
	<i>mcm6</i>						
	<i>nanog</i>						
	<i>nanos2</i>						
	<i>nanos3</i>						
	<i>ntl4 (brachyury)</i>						
	<i>plzfa</i>						
	<i>plzfb</i>						
	<i>pou2</i>						
	<i>sall4</i>						
	<i>thy1a</i>						
	<i>thy1b</i>						

**Tableau 10 : Tableau récapitulatif des gènes sélectionnés pour la recherche de marqueurs des différents types cellulaires présents dans les testicules des animaux sexuellement matures**

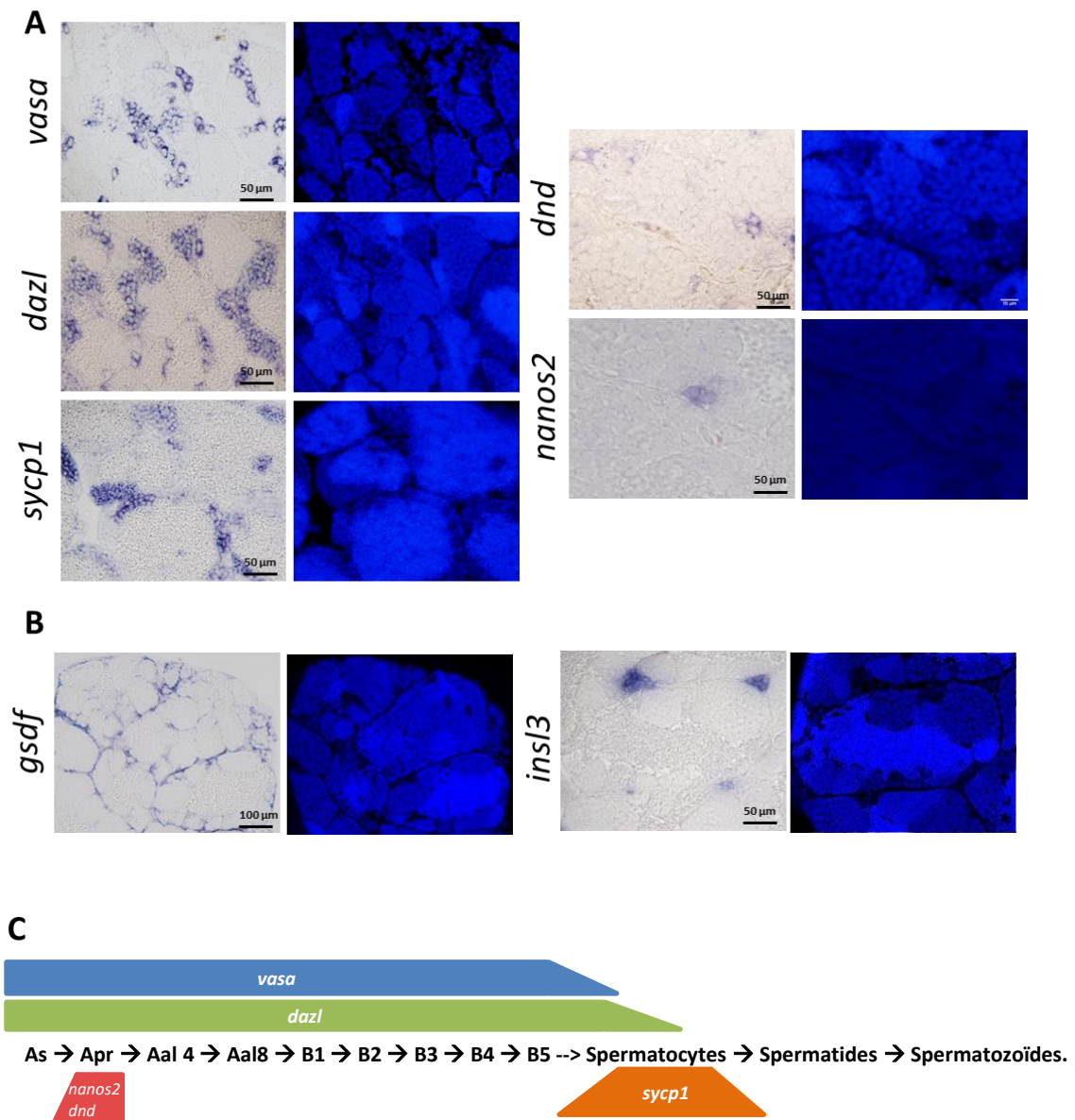
anticorps avait pourtant été utilisé avec succès chez le tilapia avec un marquage de cellules spermatogoniales isolées sur des coupes testiculaires d'animaux adultes fixées au paraformaldéhyde et montées en Paraplast (Santos Nassif Lacerda et al., 2013b).

Nous avons aussi testé des anticorps ciblant des PGC de poulet (EMA-1, SSEA1), ou des PGCs et SSC de mammifères (SSEA1, STELLA). Malheureusement, aucun signal spécifique n'a pu être obtenu avec ces anticorps sur des coupes testiculaires d'animaux sexuellement matures.

En conclusion, ces premières tentatives de marquages par immunohistochimie ne se sont pas révélées satisfaisantes. Ces difficultés peuvent s'expliquer par le fait que les antigènes hétérologues ont parfois une séquence primaire et/ou une structure assez éloignée de l'espèce d'intérêt et sont donc moins affines pour l'antigène recherché. Cependant, ces résultats peuvent aussi s'expliquer par le fait que nous avons testé des marqueurs de cellules souches très précoces (PGC). Nos cellules étant plutôt des cellules spermatogoniales présentes chez l'adulte, on se retrouve peut-être avec des cellules n'exprimant plus ces différents facteurs. Quoi qu'il en soit devant les difficultés à valider l'utilisation d'anticorps hétérologues par des analyses immunohistochimiques, nous avons orienté notre effort de recherche sur l'analyse des transcrits par la technique d'hybridation *in toto* d'ARNm sur tissu entier.

#### **1.3.1.2. Recherche de marqueurs potentiels par la technique d'hybridation in toto d'ARNm sur tissu entier (WMISH)**

Après une analyse bibliographique, nous avons présélectionné un assez large spectre de gènes candidats possiblement exprimés dans différents types de cellules testiculaires : les cellules de Sertoli (*gsdf*), les cellules de Leydig (*insl3*, *cyp17a1*), les cellules endothéliales (*fli* et *esama*), les spermatogonies (*vasa*, *nanos2*), et les spermatocytes (*sycp1*). Ce premier panel a été étendu par la suite à de nombreux gènes impliqués dans la survie des cellules germinales souches chez les poissons ou la drosophile (*dnd*, *gcl*, *dazl*), ou considérés comme marqueurs des cellules spermatogoniales souches principalement chez les mammifères (*gfra1*, *thy1*, *lifr*, *kitr*, *nanog*, *id4* etc.). La liste complète des marqueurs testés est présentée dans le tableau 10. On peut noter la présence de nombreux gènes orthologues dupliqués



**Figure 40 : Patron d'expression des transcrits spécifiques des différents types cellulaires présents dans le testicule.** A , C) Les transcrits germinaux *vasa* et *dazl* sont accumulés dans toutes populations de spermatogonies, des plus indifférenciées et isolées (Aind\*) aux spermatogonies B. Les transcrits *nanos2* et *dnd* sont détectés uniquement dans les cellules en doublet (Adiff1). *sycp1* est accumulé dans les spermatocytes primaires et secondaires. B) *insl3* et *gsdf* sont exprimés dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli, respectivement

chez le poisson-zèbre (i.e. *thy1a* et *thy1b*) qui sont issus d'une duplication totale du génome dite 3R commune à tous les poissons téléostéens. Nous avons choisi des couples d'amorces spécifiques de ces différents orthologues pour cloner des ADNc partiels allant de 500 à 2000 pb à partir de tissus gonadiques ou d'embryons de 16 jours. Nous avons ainsi pu cloner 30 ADNc partiels au total, portant à 32, le nombre d'ADNc disponible pour le crible des marqueurs par hybridation *in toto* d'ARN messenger.

Après le clonage des ADNc partiels dans le vecteur pGEM-T easy et leur validation par séquençage, nous avons réalisé la synthèse de ribosondes marquées à la digoxigénine afin d'établir le patron d'expression des transcrits par hybridation d'ARNm *in toto* sur des testicules et ovaires entiers prélevés chez des poisson-zèbre adultes sexuellement matures. Sur les 32 ribosondes antisens synthétisées, seules 8 ont révélé des patrons d'expression très restreints. Nous avons confirmé la spécificité des marqueurs de cellules somatiques comme *cyp17a1* et *insl3* pour les cellules de Leydig (figure 40) et *gsdf* pour les cellules de Sertoli. Aucun des marqueurs choisis pour les cellules endothéliales n'a pu être validé. En ce qui concerne les spermatogonies, nous montrons que les transcrits *vasa* et *dazl* sont exprimés dans toutes les spermatogonies de types A et B (*dazl* montre une expression dans les spermatocytes également). Les transcrits des gènes *nanos2* et *dnd* sont détectés exclusivement dans des spermatogonies de type A en doublet. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'expression de transcrits s'accumulant spécifiquement dans les spermatogonies de type B (figure 40). Le transcrit *sycp1* est exprimé dans les spermatocytes primaires et secondaires.

### **1.3.2. Caractérisation moléculaire *in situ* des spermatogonies exprimant la GFP.**

La technique de double hybridation en fluorescence nous a permis de mettre en avant l'expression du transgène dans des doublets de spermatogonies. Nous avons voulu utiliser cette technique pour préciser la caractérisation moléculaire des spermatogonies fluorescentes. Pour cela, nous avons réalisé une série de double hybridation *in toto* couplant l'expression de la *gfp* avec celle de marqueurs de spermatogonie en paire comme *dnd*, *nanos2*, ou des marqueurs de cellules de Sertoli comme *gsdf*. Malheureusement, après avoir testé différentes conditions de



traitement et différents temps de marquages, il ne nous a pas été possible d'avoir des résultats satisfaisants. L'hypothèse mise en avant pour expliquer ces difficultés est qu'il y a de nombreux lavages assez stringents entre les deux étapes de marquage et un traitement détruisant l'activité de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire. Ces étapes, bien que nécessaires, pourraient entraîner une forte baisse de signal. Lors de doubles hybridations entre un gène fortement exprimé (*vasa*) et un plus faiblement exprimé (*gfp*) la diminution du signal reste acceptable. En revanche, pour des gènes faiblement exprimés comme *dnd* et *nanos2* la perte de signal devient rédhibitoire.

Malgré les différentes tentatives pour améliorer cette technique, nous ne sommes pas pour le moment en mesure de réaliser de doubles marquages exploitables. Pour contourner cette difficulté, nous avons dû développer une approche alternative basée sur la caractérisation *ex-situ* des spermatogonies fluorescentes.

### **1.3.3. Caractérisation moléculaire ex situ des spermatogonies exprimant la GFP**

#### **1.3.3.1. Préparation de fractions cellulaires enrichies en cellules spermatogoniales fluorescentes.**

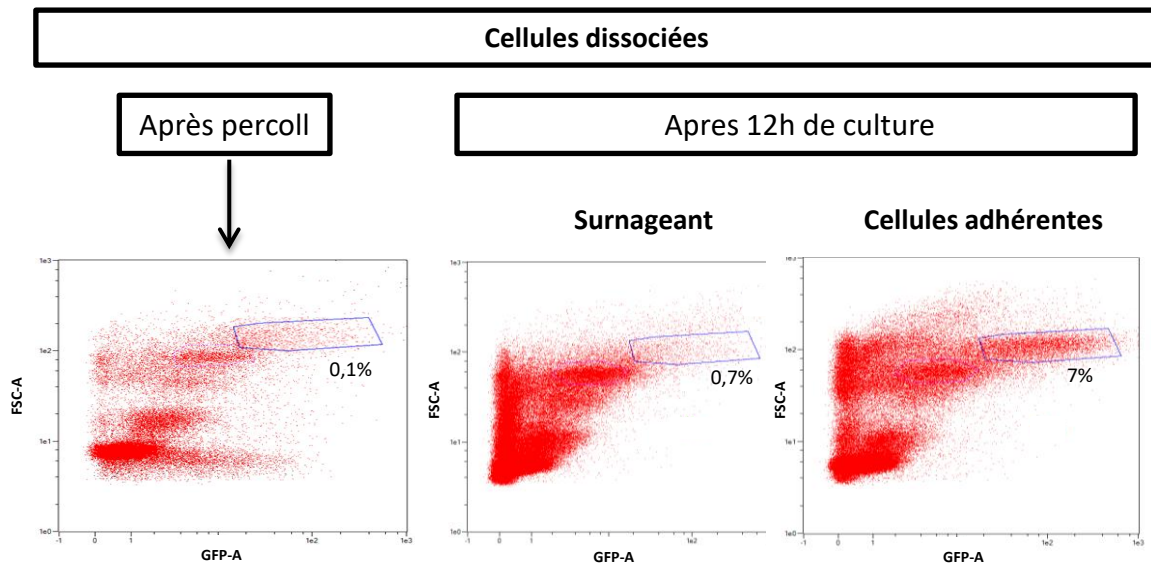
Dans un premier temps, nous avons appliqué une méthode simple qui consistait à enrichir les cellules spermatogoniales sur un coussin de percoll après une étape de dissociation des cellules testiculaires par un traitement enzymatique (Nóbrega et al., 2010a; Sakai, 2006). Cependant, la faible proportion de cellules fluorescentes observées (<0,1 %) dans la fraction cellulaire obtenue ne nous permettait pas de délimiter les contours d'une population de cellules fluorescentes sur les profils de cytométrie en flux. Afin d'améliorer la procédure de pré-enrichissement, nous avons dû ajouter une étape de culture *in vitro*. Les cellules testiculaires dissociées et préalablement enrichies sur un coussin de percoll, pour éliminer les spermatozoïdes et les hématies, sont déposées une nuit dans des puits préalablement recouverts de gélatine (Hinfray et al., 2013). Dans ces conditions, nous avons observé que la plupart des spermatogonies fluorescentes adhéraient au support alors que, la majorité des spermatocytes, des spermatides et des spermatozoïdes restaient dans le surnageant des puits de culture. La morphologie des cellules fluorescentes, observées après une nuit de culture, restait conforme à

nos attentes, avec de nombreuses cellules fluorescentes de formes arrondies et en doublets. L'analyse par cytométrie en flux a permis de vérifier le très net enrichissement (de 0,1 % à 7-10%) des cellules fluorescentes dans la fraction adhérente par rapport aux cellules restées dans le surnageant (figure 41). Les étapes de pré-enrichissement successif nous ont permis, i) de diminuer les risques de contaminations des cellules triées, ii) de diminuer le temps nécessaire au tri des cellules par la technique du FACS et iii) de récupérer plus de cellules fluorescentes par heure de tri. Dans nos conditions d'expérimentation, 75 poissons âgés d'environ 5 mois permettent d'obtenir environ 500 mg de poids frais de testicules et environ 1 million de cellules fluorescentes. Le rendement de l'extraction des ARN totaux a été jugé satisfaisant avec 1,5 µg d'ARN total.

Afin de pouvoir vérifier la pureté de notre fraction cellulaire triée et de caractériser le type cellulaire majeur présent dans cette fraction, nous avons analysé l'abondance relative de transcrits exprimés par différents types cellulaires présents dans le testicule.

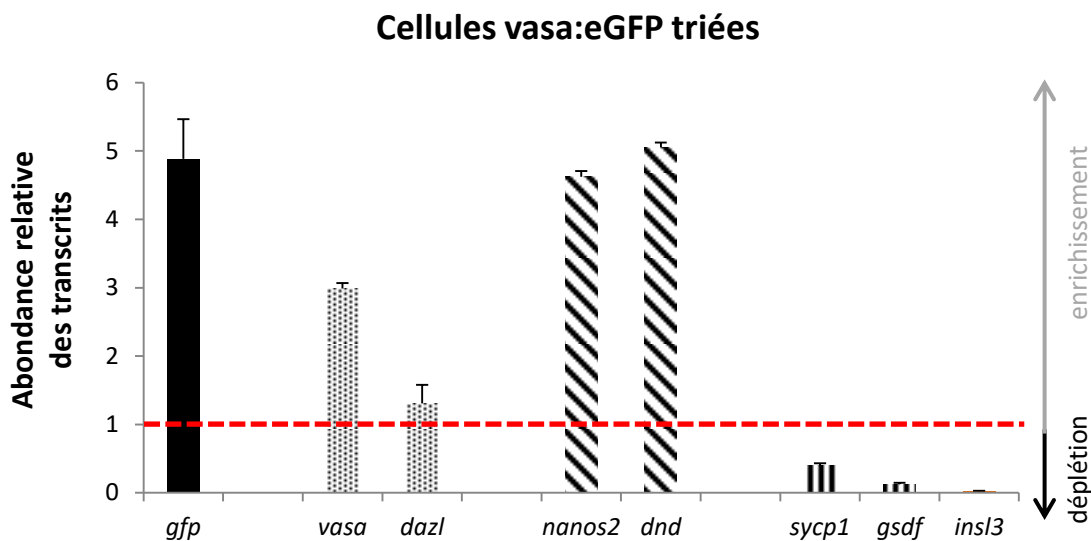
#### **1.3.3.2. Analyse moléculaire des spermatogonies fluorescentes triées.**

La caractérisation de la fraction de cellules fluorescentes, isolées à partir des testicules de poisson-zèbre adulte Dr\_vasa :eGFPtoI2, a été réalisée par qPCR à l'aide du panel de marqueurs décrit précédemment. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de contamination significative évidente de la fraction de cellules fluorescentes par les cellules somatiques (cellules de Sertoli et de Leydig), ou par les spermatocytes, en raison de l'absence ou de la très forte chute des niveaux d'accumulation des transcrits *gsdf*, *insl3* et *sycp1*, respectivement (figure 42). En revanche, la forte augmentation de l'abondance relative des transcrits *vasa* et *gfp* montre qu'il y a un enrichissement des cellules spermatogoniales fluorescentes dans la fraction triée par rapport à la fraction non triée au FACS (figure 42). L'abondance relative des transcrits *dazl* est également augmentée, mais dans une moindre mesure. Cela peut s'expliquer par le fait que ce gène est exprimé dans de nombreuses cellules germinales différentes (spermatogonies et spermatocytes primaire) qui sont bien représentées dans la fraction non triée. Ceci a pour conséquence de diminuer l'enrichissement relatif des transcrits *dazl*. De manière



**Figure 41 : Profil de cytométrie des cellules dissociées avant et après l'étape de culture sur la nuit.**

Après dissociation, nous avons dans un premier temps analysé la fraction de cellules totales récoltées juste après l'étape de purification sur coussin de percoll. Dans ces conditions, la population d'intérêt ne représentait que 0,1% des événements détectés par le cytomètre en flux. La mise en place de l'étape de pré-enrichissement permet de faire ressortir nettement la population de spermatogonies fluorescentes, faisant passer sa représentation de 0,7% à 7%.



**Figure 42 : La fraction cellulaire triée à partir de la lignée *vasa:eGFP<sup>tol2</sup>* est enrichie en spermatogonies.** L'abondance relative des transcrits *gfp* (spermatogonies fluorescentes), *gsdf* (cellules de Sertoli), *insl3* (cellules de Leydig), *vasa* (spermatogonies A et B), et *sycp1* (spermatocytes primaires et secondaires) a été mesurée par qPCR à partir d'ARN total extrait des cellules triées et non triées. Seuls les gènes exprimés dans les spermatogonies sont enrichis dans les cellules triées, et en particulier, ceux détectés majoritairement dans les spermatogonies Apr par hybridation in toto d'ARNm.

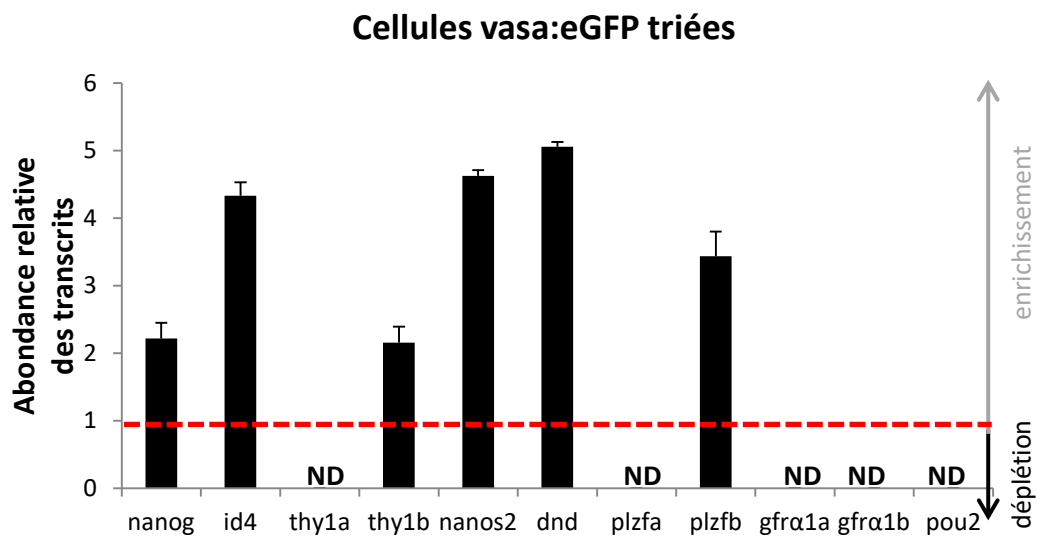
intéressante, les abondances relatives des transcrits *nanos2* et *dnd*, correspondant aux deux marqueurs de cellules spermatogoniales en paires, sont encore plus fortement augmentées dans la fraction de cellules triées (figure 42). Cette observation indique que la fraction de spermatogonies fluorescentes est plus particulièrement enrichie en spermatogonies de type Apr.

Dans un second temps, nous avons approfondi la caractérisation des cellules triées en analysant le patron d'expression des gènes proposés comme marqueurs de SSC chez les mammifères ou certaines espèces de poissons (figure 43). Pour les gènes peu ou pas détectés dans le testicule ou les cellules triées, nous avons dû optimiser les amorces à partir de produits de rétro-transcription des ARN totaux d'ovaires (*ckita*, *igfrb*, *plzfa*) ou de cerveaux (*gfra1a*, et *gfra1b*). Le gène *Id4* est sans conteste l'un des marqueurs les plus reconnus des SSC chez les mammifères. L'abondance relative des transcrits *Id4* est fortement augmentée d'un facteur 4 dans la fraction purifiée. De même, l'abondance relative des transcrits *plzfb* est nettement augmentée d'un facteur 3 alors que l'isoforme *plzfa* n'est pas détectée. Les anticorps dirigés contre la protéine de surface Thy1 sont couramment utilisés pour purifier les pré-spermatogonies chez les rongeurs. Une très légère diminution du niveau d'expression des transcrits *thy1b* dans les cellules triées est observée. L'expression du gène *nanog*, un marqueur de pluripotence des cellules souches adultes, se trouve augmentée d'un facteur 2. A l'inverse, aucune expression significative des transcrits correspondants aux deux gènes paralogues *gfra1a* et *gfra1b* et au gène *pou2* (gène ancestral de l'*oct4/pou5f1* des mammifères) n'a pas pu être détectée dans les cellules triées (figure 43).

En résumé, la forte augmentation de l'abondance relative des transcrits *id4*, *nanos2*, *dnd*, *nanog*, et *plzfb* dans les cellules triées exprimant la GFP est en accord avec l'hypothèse que ces cellules pourraient faire partie du stock de cellules souches spermatogoniales chez le poisson-zèbre adulte.

#### **1.4. Analyse des propriétés fonctionnelles des cellules spermatogoniales fluorescentes triées**

##### **1.4.1. Analyse ex situ par transplantation cellulaire**



**Figure 43 : Abondance relative de transcrits codant pour des marqueurs de SSC dans les cellules fluorescentes triées.**

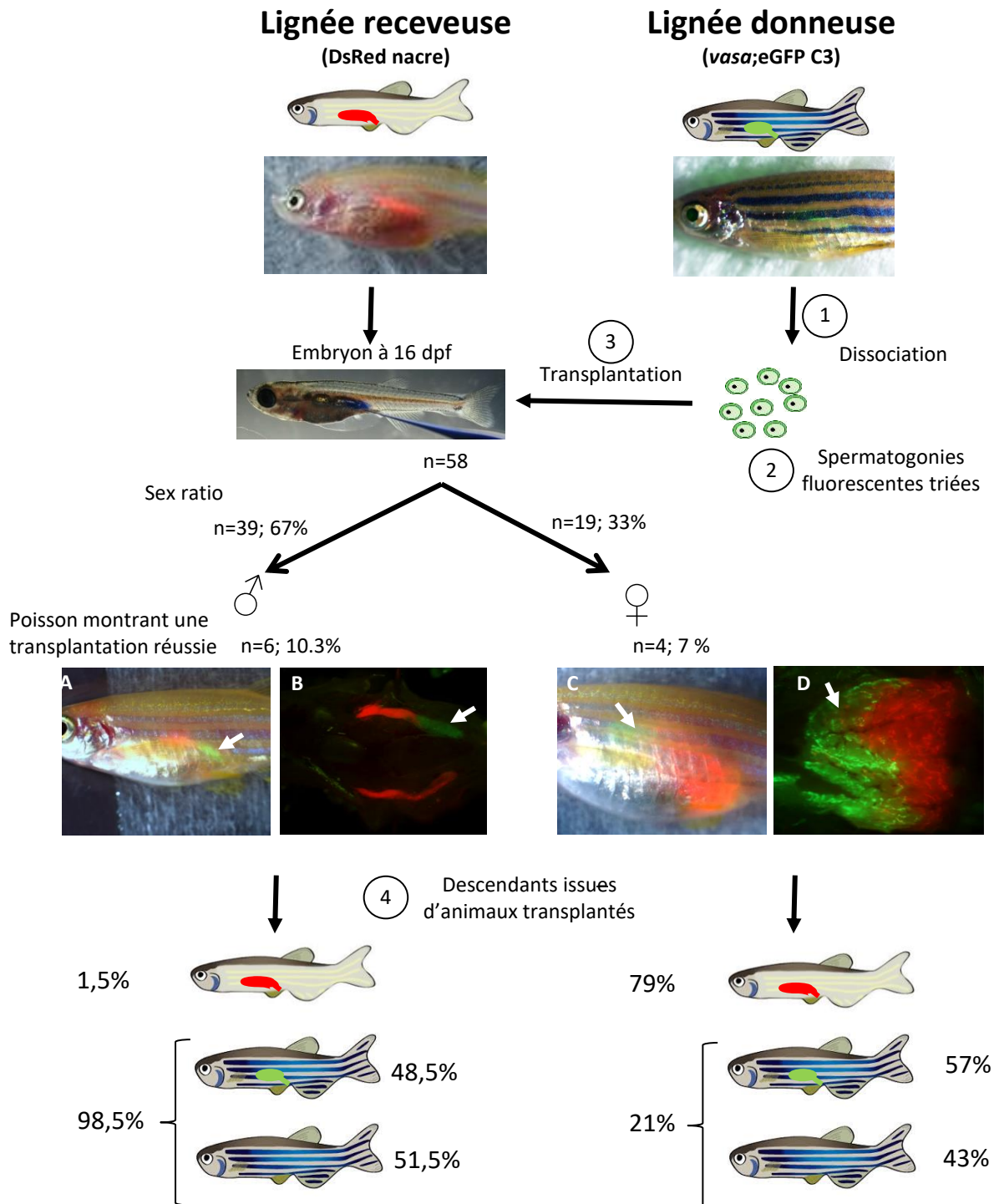
L'abondance relative de marqueurs de cellules souches spermatogoniales connus (*nanog*, *id4*, *nanos2*, *plzf*...) est augmentée dans les cellules fluorescentes triées par rapport aux cellules non triées. Cependant, dans nos conditions expérimentales, d'autres marqueurs des SSC bien identifiés chez les mammifères adultes comme l'orthologue de *pou2* (*pou5f1/oct4*) ou les orthologues de *gfra1* ne sont pas détectés dans la fraction triée.

Étant donné que les cellules fluorescentes triées exprimaient bien certains marqueurs reconnus des cellules souches spermatogoniales de mammifères et/ou des spermatogonies indifférenciées chez les poissons, nous avons cherché à évaluer la capacité de ces cellules à coloniser la gonade et à générer des gamètes fonctionnels après transplantation. Nous avons choisi une technique de transplantation éprouvée chez différentes espèces de poissons et chez le poisson-zèbre. Elle consiste à injecter les spermatogonies purifiées dans la cavité abdominale d'un alevin receveur.

Le choix de la souche receveuse s'est porté sur une lignée mutante maintenue dans notre élevage et qui ne possède plus de rayures noires en raison de l'absence du pigment mélanine. En plus de ce caractère récessif, qui est responsable de la couleur de robe jaune de ces poissons, la lignée mutante exprime la protéine DsRed sous le contrôle du promoteur *vasa*. L'expression de ce transgène, qui dérive de la lignée tg117 générée par le groupe du Dr Paul Collodi (Université de Purdue, USA), facilite la visualisation des gonades chez les animaux injectés et la co-localisation des cellules transplantées exprimant la GFP.

Les cellules spermatogoniales fluorescentes, purifiées à partir de la lignée Dr\_ *vasa*:eGFP<sup>tol2</sup>, ont été injectées dans des embryons de 16 jours à raison de 20<sup>6</sup> cellules/ml. Les 58 animaux transplantés et qui ont survécu jusqu'au bout de l'expérimentation ont été observés régulièrement jusqu'à l'âge de 5 mois pour détecter l'apparition et le développement d'une fluorescence verte au niveau des gonades, synonyme d'une colonisation de la gonade par les cellules GFP positives transplantées. Les 48 animaux ne présentant pas de fluorescence verte ont été sacrifiés et vérifiés méticuleusement par observation microscopique. Chez les 10 autres animaux (6 mâles et 4 femelles), soit 17 %, nous avons pu observer de manière non invasive une fluorescence verte au niveau des gonades avec la particularité que cette fluorescence était localisée de manière complémentaire à la fluorescence rouge (figure 44). Cette observation préliminaire a pu être confirmée au moment de la dissection des animaux aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Ainsi nos observations indiquaient bien que la fraction triée contenait des cellules spermatogoniales fluorescentes capables de recoloniser la gonade d'un animal receveur après transplantation.

Avant d'être sacrifié chaque animal, présentant une fluorescence verte au niveau des gonades, a été mis en reproduction avec un poisson de la lignée mutante



**Figure 44 : Transplantation des cellules fluorescentes triées à partir de la lignée *Dr\_vasa:eGFPtol2*.**

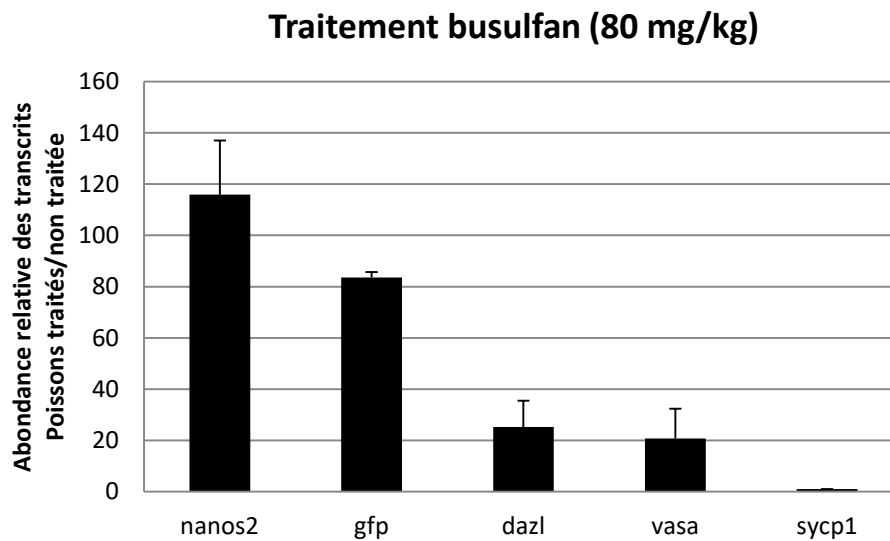
Schéma montrant les différentes étapes de la transplantation des cellules fluorescentes de la lignée *Dr\_vasa:eGFP* dans des embryons receveurs *vasa:Dsred* (16 jours) et élevés jusqu'à la maturité sexuelle. Une partie a été sacrifiée afin de vérifier la réussite de la transplantation qui est révélée par la présence de cellules germinales fluorescentes vertes dans les gonades (A, B, C, D). Les autres animaux ont été mis en reproduction avec un individu de sexe opposé et appartenant la lignée *DsRed* dorée. La présence de descendants de type AB révèle que les gamètes issus des cellules germinales transplantées sont fonctionnels. De plus, la ségrégation du transgène dans les descendants de type AB est en accord avec l'hétérozygotie du transgène dans les cellules fluorescentes triées et les lois de ségrégation mendéliennes. (A,B) Colonisation régionalisée des cellules exprimant la GFP (verte) au sein du testicule. (C, D) Colonisation régionalisée des cellules exprimant la GFP au sein de l'ovaire.

« golden » de sexe opposé. Dans chacune des descendance obtenues, nous avons pu observer des individus avec la robe sauvage AB. On peut noter que les descendance issues des animaux mâles contenaient près de 99 % d'animaux de type AB contre seulement 20 % pour les femelles transplantées avec succès. Les raisons de cette différence restent encore énigmatiques. De plus, environ 50 % de ces descendants AB exprimaient le transgène GFP au niveau des gonades. Aucune expression du transgène GFP n'a été observée dans les descendants présentant une robe de type « golden ». Ces observations sont en accord avec l'origine du fond génétique AB et l'hétérozygotie du transgène des cellules germinales transplantées (figure 44). Ainsi, cette série de travaux démontre que la fraction triée et transplantée contient des cellules spermatogoniales fluorescentes qui ont la capacité de coloniser les gonades et de générer de manière pérenne des gamètes mâles et femelles fonctionnels.

#### **1.4.2. Analyse *in situ* à l'aide d'un agent cytotoxique**

Dans l'optique de vérifier, par une approche *in situ*, le statut de cellules souches des spermatogonies fluorescentes, nous avons observé leur devenir après traitement des poissons avec un agent cytotoxique, le busulfan. Chez les rongeurs, il est bien reconnu que les SSC sont les cellules germinales qui résistent le mieux à cet agent alkylant après l'administration d'une dose unique standard de 40 mg/kg. Nous avons injecté des poissons-zèbre mâles adultes, préalablement acclimatés à 35°C pendant 12 jours, avec deux doses successives de busulfan à raison de 80 mg/kg. Il faut noter que la dose supérieure de busulfan testée (120 mg/kg) engendrait plus de 30 % de mortalité à 24h contre 10 % pour la dose de 80 mg/kg. Bien que la taille des testicules ait été grandement réduite, les cellules spermatogoniales fluorescentes étaient toujours présentes 14 jours après la première injection dans les gonades mâles. Une analyse par qPCR a confirmé le maintien de l'abondance relative des transcrits *nanos2* et *gfp*, alors que les transcrits de *vasa*, *dazl*, et *sycp1*, qui sont exprimés respectivement dans les spermatogonies notamment différenciées (*vasa*, *dazl*) et les spermatocytes (*sycp1*), montrent une sévère diminution de leur niveau d'expression (Figure 45). Ces résultats démontrent que les cellules spermatogoniales fluorescentes sont des cellules germinales particulièrement résistantes à un agent cytotoxique comme le busulfan. Des analyses histologiques sont toujours en cours





**Figure 45 : Les spermatogonies fluorescentes résistent à un traitement par un agent cytotoxique.**

Les marqueurs des cellules spermatogoniales les plus tardives et des spermatoocytes (*vasa*, *dazl*, *sycp1*) subissent une très forte diminution de leur abondance relative, sous-entendant une perte importante de ces types cellulaires. A l'inverse, l'abondance relative des marqueurs des spermatogonies Apr (*gfp* et *nanos2*) est maintenu. En conséquence, les cellules spermatogoniales fluorescentes résistent mieux à un agent cytotoxique que les cellules spermatogoniales différenciées.

pour préciser la nature exacte des différentes populations spermatogoniales qui résistent au traitement.

### **1.5. Bilan des résultats obtenus**

En résumé, l'ensemble des travaux de ce chapitre montrent que le transgène GFP s'exprime d'abord dans des spermatogonies indifférenciées impliquées dans des doublets asymétriques de types  $A_{pr}$ . Les cellules spermatogoniales fluorescentes ont la capacité, i) de coloniser les gonades d'un individu donneur, ii) d'être bipotente, car elles génèrent des gamètes mâles ou femelles selon le sexe de l'animal receveur, iii) d'initier et de maintenir une gamétogenèse produisant des gamètes fonctionnels possédant les mêmes caractéristiques génétiques et iv) de résister à un agent cytotoxique. Ainsi, la fraction de spermatogonies fluorescentes triées contient bien des cellules possédant toutes les propriétés fonctionnelles reconnues des SSC de poissons. Ceci nous amène à proposer que les cellules  $A_{pr}$  fluorescentes décrites dans ce chapitre aient un devenir bivalent : elles peuvent poursuivre leur différenciation ou participer au renouvellement du stock de SSC *in vivo* après fragmentation des doublets.

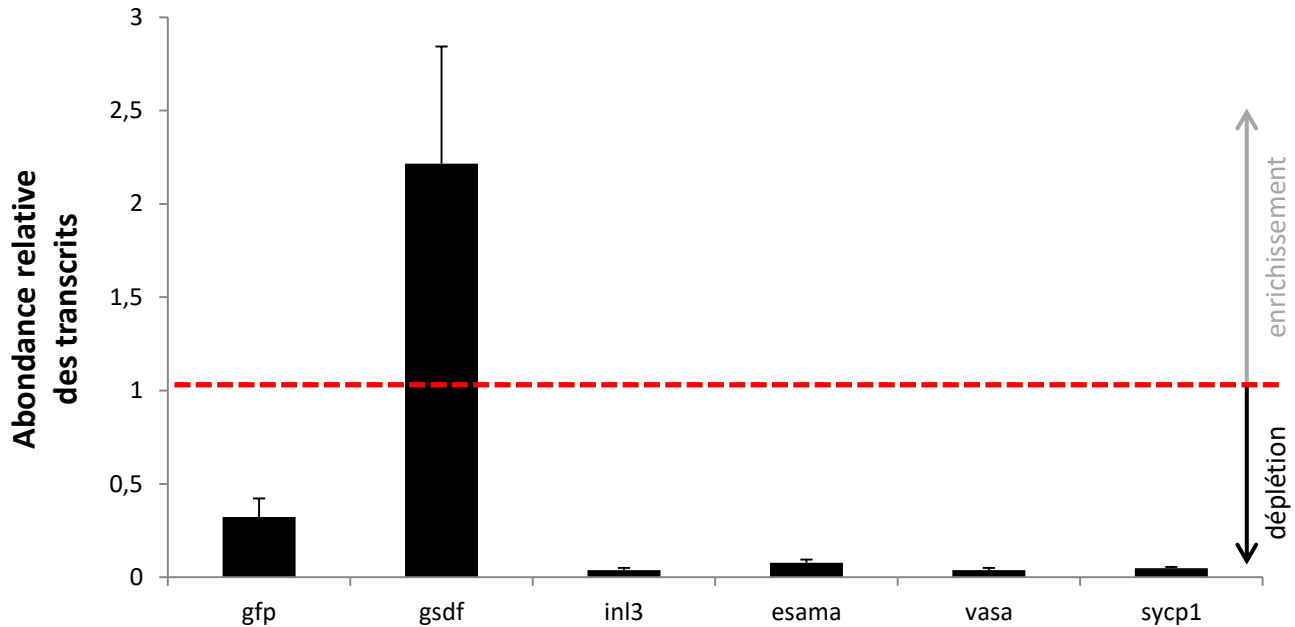


# RESULTATS

---

**Partie 2 : Identification de nouvelles voies de régulation  
paracrine potentiellement impliquées dans la régulation du  
stock de SSC**

## Cellules *gsdf*:eGFP triées



**Figure 46 : La fraction cellulaire triée à partir de la lignée *gsdf*:eGFP<sub>tol2</sub> est enrichie en cellules de Sertoli.** L'abondance relative des transcrits *gfp* (cellules de Sertoli), *gsdf* (cellules de Sertoli), *insl3* (cellules de Leydig), *vasa* (spermatogonies A et B), *esama* (cellule endothéliales) *sycp1* (spermatocytes primaires et secondaires) a été mesurée par qPCR à partir d'ARN total extrait des cellules triées et non triées. Seuls les gènes exprimés dans les cellules de Sertoli sont enrichis dans les cellules triées.

Les travaux réalisés dans le cadre du chapitre 1 ont montré que les spermatogonies fluorescentes isolées de la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2 constituaient une population de cellules souches spermatogoniales regroupant majoritairement des cellules de type A<sub>pr</sub> même si la présence de cellules redevenues A<sub>s</sub> n'était pas à exclure. En conséquence, nous avons considéré que la fraction de spermatogonies fluorescentes était bien appropriée pour identifier des récepteurs membranaires présents à la surface des SSC et susceptibles d'être impliqués dans le contrôle de leur devenir. Pour identifier ces récepteurs, nous avons mis en œuvre une approche de séquençage à haut débit des transcrits exprimés au sein de la fraction spermatogoniale fluorescente.

Nous avons conduit la même stratégie pour déterminer si les ligands potentiels de ces récepteurs étaient bien exprimés par les cellules de Sertoli. Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules de Sertoli fluorescentes de la lignée Dr\_gsd:f:eGFPtol2 en suivant la même procédure décrite pour les spermatogonies fluorescentes de la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2. La spécificité cellulaire ou l'absence de contamination des fractions des cellules de Sertoli triées ont été vérifiées par qPCR en utilisant le panel de marqueurs cellulaires validé par hybridation d'ARN *in toto*. On retrouve bien un enrichissement relatif des transcrits du gène sertolien *gsdf* et une forte diminution relative ou une absence de tous les autres transcrits correspondant aux marqueurs des cellules spermatogoniales, spermatocytes et des cellules de Leydig (figure 46).

Nous avons préparé, en plus des ARN issus des deux fractions triées, l'ARN total issu des fractions de cellules testiculaires recueillies juste avant le tri. La comparaison des transcrits présents dans les fractions triées et non triées, permet de déterminer les gènes préférentiellement exprimés dans les spermatogonies et les cellules de Sertoli. D'autre part, nous avons extrait l'ARN total des testicules d'animaux adultes dépourvus de toutes cellules germinales après l'injection du morpholino anti-Dnd. Cet échantillon est destiné à identifier les gènes spécifiquement exprimés dans les cellules germinales. Enfin, nous avons complété nos échantillons avec de l'ARN total extrait des testicules d'animaux adultes (6 mois environ), principalement pour identifier les gènes germinaux surexprimés dans les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques (spermatocytes, spermatides et

<b>Fractions d'intérêts</b>	<b>Composition cellulaire</b>
Lignée vasa :eGFP	Spermatogonies Ap
Lignée gsdf :eGFP	Cellules de Sertoli
Fraction non triée	Cellules de Sertoli, cellules interstitielles, spermatogonies A et B, spermatocytes.
Fraction testiculaire traité au morpholino	Cellules de Sertoli, Cellules interstitielles.
Fraction testiculaire totale	Cellules de Sertoli, cellules interstitielles, spermatogonies A, B, spermatocyte, spermatides, spermatozoïdes.

**Tableau 11 : Récapitulatif des différentes fractions d'intérêt envoyées en séquençage, et de leur composition cellulaire.**

spermatozoïdes) qui sont très majoritaires par rapport aux spermatogonies dans les testicules d'animaux sexuellement matures (tableau 11).

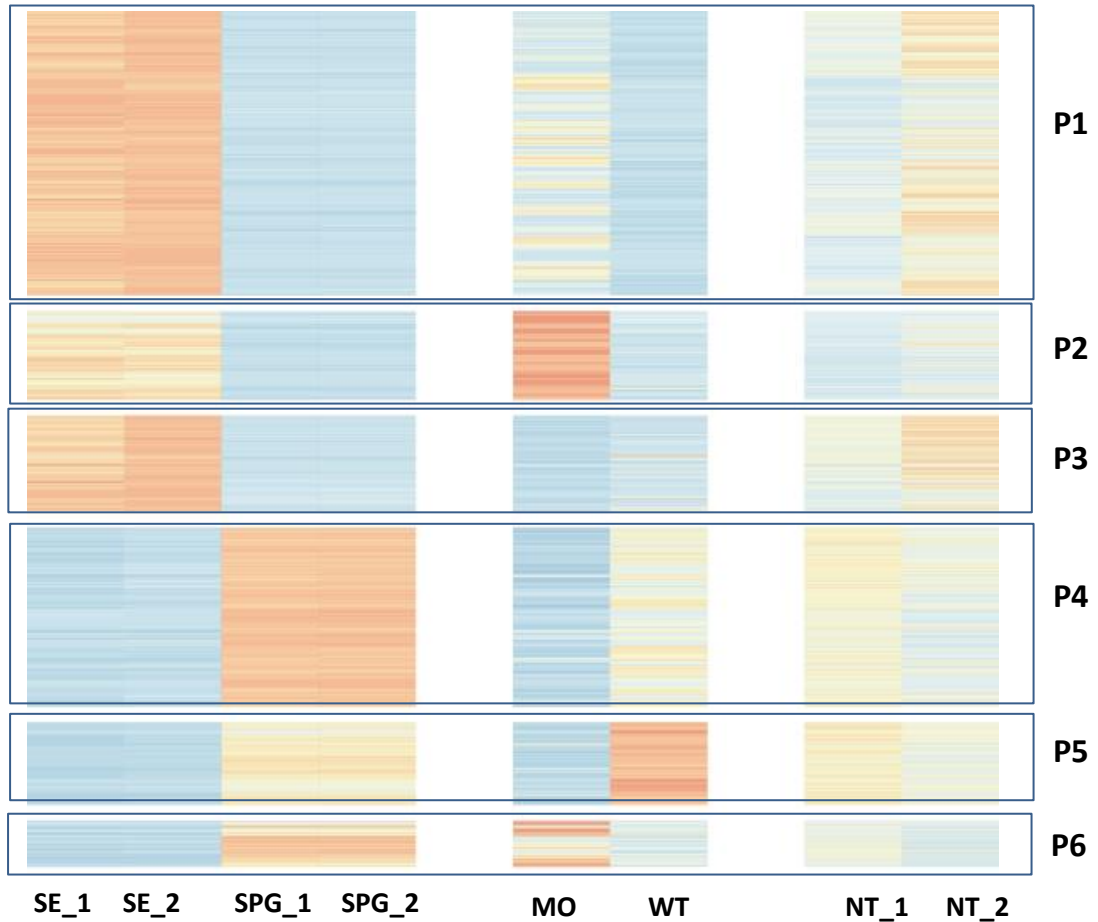
Pour des raisons de contrainte de temps et de non disponibilité d'animaux, le séquençage à très haut débit (RNAseq, illumina) a été réalisé sur deux réplicas biologiques pour les cellules de Sertoli et pour les cellules non triées, et sur un duplicata d'ARN total issu d'une seule préparation de spermatogonies. Nous n'avons pas pu séquencer d'ARN total issu de testicules d'animaux traités au busulfan comme initialement prévu, car le protocole n'était pas optimisé à cette échéance. De même, pour des raisons budgétaires, les transcrits issus de testicules d'animaux sexuellement matures ou issus des animaux traités avec le morpholino anti-Dnd ont été séquencés à partir d'un seul échantillon biologique.

L'assemblage *de novo* des lectures matchant la version 10 du génome du poisson-zèbre a permis de reconstruire un total de 157905 transcrits potentiels. Les transcrits mono-exoniques, et ceux dont l'expression ne dépassait pas le bruit de fond fixé à 3 fpkm (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) dans les cellules de Sertoli ou les cellules spermatogoniales ont été éliminés. Au final, une liste de 15968 transcrits représentant 12149 gènes a été retenue pour notre analyse.

Avant de détailler les analyses réalisées, on peut noter que les duplicatas provenant des cellules non triées sont plus variables entre eux que les duplicatas provenant des cellules de Sertoli triées. Cela pourrait s'expliquer par le fait que nous avons des duplicatas biologiques et que les proportions des différents types de cellules adhérant au fond des puits de culture sont probablement plus variables d'une préparation à l'autre que le transcriptome des cellules purifiées qui par définition devrait être plus homogène. On peut également constater que le séquençage RNAseq est très reproductible car le replica technique de la fraction spermatogoniale est le plus homogène.

## **1. Analyse globale du transcriptome des différents types cellulaires purifiés**





**Figure 47 : Représentation schématique des différents cluster P1, P2, P3, P4, P5 et P6 généré après analyse transcriptomique.**

Le dégradé de couleur permet d'identifier les gènes dont l'expression est augmentée (rouge/orangé) ou diminuée (bleu). SE : Fraction de cellules de Sertoli, SPG : Fraction de cellules spermatogoniales indifférenciées, MO : Fraction cellulaire issus de testicules traitées au morpholino, WT : Fraction cellulaire issus de testicules totales. NT : Fraction de cellules non-triées.

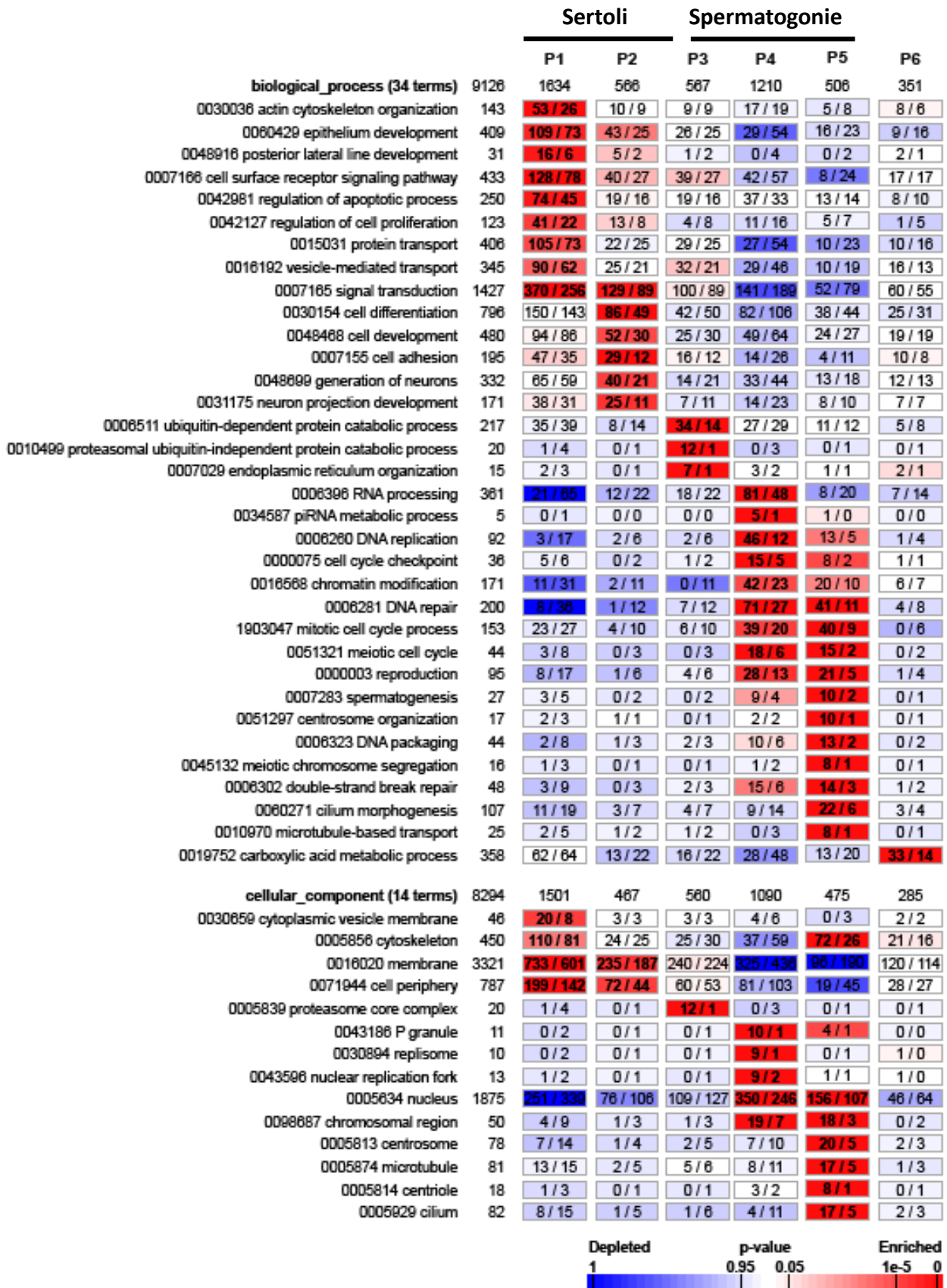
Bien que nous ayons préalablement validé l'identité cellulaire des fractions cellulaires purifiées par qPCR, à l'aide d'un panel de marqueurs des différents types cellulaires de la gonade, nous avons voulu vérifier que la signature moléculaire des différentes fractions cellulaires purifiées, était conforme aux propriétés moléculaires et fonctionnelles attendues des cellules de Sertoli et des SSC. La comparaison des transcriptomes a été réalisée à l'aide d'un clustering supervisé qui a distingué 7 groupes de gènes présentant des profils d'expression différents selon les 5 situations expérimentales. Ces profils sont illustrés sur la représentation graphique de la figure 47 à l'exception du cluster P0. Ce cluster P0 regroupe les gènes qui ne sont pas différentiellement exprimés entre les cellules de Sertoli et les spermatogonies purifiées. Les autres clusters P1, P2 et P3 d'une part et P4, P5, P6 d'autre part, constituent des groupes de gènes préférentiellement exprimés dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales purifiées, respectivement. Pour vérifier que les fonctions de ces gènes « cellules spécifiques » étaient bien en cohérence avec les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles attendues des cellules purifiées, nous avons recherché pour chaque cluster les enrichissements des termes utilisés pour annoter ces gènes dans la base de données « Gene Ontology ».

### **1.1. Analyse du transcriptome des cellules de Sertoli**

Les gènes exprimés préférentiellement dans les cellules de Sertoli par rapport aux spermatogonies purifiées ont été classés en 3 groupes (P1, P2, P3) en raison de leurs profils d'expression différents dans les autres conditions expérimentales. En effet, le transcriptome des cellules de Sertoli est particulièrement perturbé en absence de cellules germinales. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'un dialogue réciproque entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

#### **Cluster P1 :**

Le cluster P1 correspond à des gènes dont l'expression est préférentiellement observée dans les cellules de Sertoli par rapport aux spermatogonies purifiées. Cependant, l'expression de ces gènes est peu perturbée dans les testicules dépourvus de cellules germinales (échantillon MO). Les gènes impliqués dans le développement de nombreux épithélia sont particulièrement représentés dans ce



**Figure 48 : Représentation schématique des différents processus biologique et composant cellulaires enrichie ou appauvri dans les différents clusters.**

Le dégradé de couleur permet d'identifier les gènes dont l'expression est augmenté (rouge) ou diminué (bleu).

cluster et cette observation est en accord avec le caractère épithélial des cellules de Sertoli. On note aussi un enrichissement de gènes impliqués dans les activités de synthèse, de transport intracellulaire et de sécrétion des protéines, ce qui est cohérent avec la forte activité sécrétrice connue des cellules de Sertoli (figure 48). Dans ce cluster, on remarque la présence du gène *ldha* qui est nécessaire à la production de lactate par les cellules de Sertoli. Chez les mammifères, le lactate est un métabolite énergétique majeur nécessaire à la survie des cellules germinales et à la régulation de leur différenciation.

### **Cluster P2 :**

Le cluster P2 regroupe des gènes dont l'expression est augmentée dans les testicules dépourvus de cellules germinales (échantillon MO). Ces gènes pourraient être régulés négativement par les cellules germinales. Les gènes impliqués dans les processus d'adhésion des cellules sont particulièrement surreprésentés dans ce cluster. On y retrouve des gènes codants pour des protéines apparentées aux cadhérines, à la laminine, et aux intégrines qui sont connues pour stabiliser l'adhérence des cellules germinales à la surface des cellules de Sertoli chez les mammifères. Le cluster P2 est également enrichi en gènes impliqués dans les processus de développement et de différenciation cellulaire (figure 48). Plusieurs gènes sont particulièrement d'intérêt dans le contexte des cellules de Sertoli. Le gène *sox9* est préférentiellement exprimé dans les cellules de Sertoli et il est indispensable à leur différenciation. On y retrouve aussi le gène *gata6* qui est préférentiellement exprimé dans les cellules de Sertoli fœtales et adultes chez les mammifères. Ce gène *gata6* est impliqué dans l'ontogenèse des cellules de Sertoli. Enfin, le gène *gsdf* qui est exprimé spécifiquement dans les cellules de Sertoli chez les poissons-téléostéens est également présent dans ce cluster. L'expression de ce gène, au cours du développement, est corrélée avec la différenciation testiculaire.

### **Cluster P3 :**

Ce cluster P3 regroupe des gènes dont l'expression chute dans les testicules en absence de cellules germinales. L'expression de ces gènes serait donc plutôt régulée positivement par les cellules germinales. Les gènes impliqués dans le catabolisme protéique dépendant ou non de l'ubiquitine sont particulièrement représentés dans ce cluster. On y retrouve de nombreux gènes codant pour

différentes sous-unités du protéasome ainsi que des gènes impliqués dans l'ubiquitination des protéines (figure 48). Il est également à noter que ce cluster montre un enrichissement des gènes impliqués dans l'organisation du réticulum endoplasmique. La forte baisse de l'expression de ces gènes suggère une profonde perturbation de la stœchiométrie des protéines dans les cellules de Sertoli lorsque ces dernières ne sont plus en contact avec les cellules germinales. Le cluster P3 contient également le gène *amh* qui est un marqueur bien connu des cellules de Sertoli. L'Amh est spécifiquement sécrétée par les cellules de Sertoli et inhibe la différenciation des spermatogonies chez les poissons-téléostéens.

De manière inattendue, une expression faible, mais significative, du transcrite codant pour le récepteur à la Lh est observée dans le cluster P1, ce qui aurait pu être le reflet d'une contamination de la fraction purifiée par les cellules de Leydig. Cependant, il semble que cette hypothèse peut être écartée, car aucune expression significative de transcrits codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes sexuels n'a été détectée (*star*, *SCC*, *cyp17a*, *cyp19a1*, *cyp19a2*, *Cyp1a*, *cyp11a1*, *cyp11a2*), à l'exception de la 3-bêta HSD qui affiche une valeur d'expression à la limite du bruit de fond. De même, aucune expression significative du gène *insl3* n'est détectée.

Chez les poissons, aucun marqueur des cellules péri-tubulaires de type myoïde (PTMC) n'a été formellement caractérisé. On note cependant l'expression dans la fraction purifiée de certains gènes proposés comme marqueurs des PTMC chez les mammifères, bien que leur expression reste relativement faible (tropomyosine 1, sous unité inhibine beta a, collagène de types 1 et 4). Par contre, aucune expression de la fibronectine ou de la chaîne lourde 11 de la myosine n'a été détectée dans la fraction purifiée.

Une analyse détaillée des données, révèle l'absence de transcrits codants pour le récepteur de la Fsh. Ces récepteurs sont pourtant connus pour jouer un rôle essentiel dans la régulation des fonctions sertoliennes. De même, aucune expression significative du transcrite codant pour la sous-unité alpha de l'inhibine n'a pu être détectée dans les cellules de Sertoli purifiées, alors que l'inhibine joue un rôle prépondérant dans le rétrocontrôle de la synthèse de la Fsh. L'absence de ces

transcrits pourrait être due à la culture des cellules de Sertoli dans un milieu inapproprié au maintien de l'expression de ces gènes (absence d'hormones).

En conclusion, bien que le processus de purification ait pu perturber le transcriptome des cellules de Sertoli purifiées, l'analyse des clusters P1, P2 ou P3 confirme que le transcriptome de la fraction purifiée est globalement bien représentatif des cellules de Sertoli et donc approprié à la recherche de ligands susceptibles d'agir sur les récepteurs présents à la surface des spermatogonies indifférenciées.

## **1.2. Analyse du transcriptome des cellules spermatogoniales purifiées**

Les gènes exprimés préférentiellement dans les cellules spermatogoniales par rapport aux cellules de Sertoli purifiées ont été classés en 3 groupes (P4, P5, P6).

### **Cluster P4 :**

Le cluster P4 regroupe des transcrits dont l'abondance relative est fortement enrichie dans la fraction de spermatogonies purifiées par rapport aux fractions cellulaires non triées. Ces transcrits disparaissent dans les testicules dépourvus de cellules germinales ce qui indique qu'ils sont spécifiques de la lignée germinale. D'autre part, ces transcrits restent peu abondants dans les testicules des animaux sexuellement matures ce qui suggère qu'ils sont peu ou pas exprimés dans les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques.

Les transcrits codant pour des protéines impliquées dans la maturation des ARN, en particulier de type piRNA, sont particulièrement surreprésentés dans ce cluster (figure 48). Il est bien admis que les piRNA sont particulièrement abondants dans les spermatogonies. On observe également un enrichissement des transcrits codant pour des protéines impliquées dans les divisions cellulaires (mitotiques et méiotiques), la réplication de l'ADN et le contrôle des étapes du cycle cellulaire, en particulier de la phase G2 (*chek1*, *fanci*, *ticrr*) et de la phase d'assemblage du fuseau de division (*fanci*, *ticrr*, *mad1/1*, *mad2/1*). Il est intéressant de noter qu'il existe une phase de « repos » entre la phase G2 et le checkpoint de l'assemblage du fuseau de division. De manière remarquable, sous le terme « modification de la chromatine »

on retrouve un enrichissement de transcrits codant pour des protéines impliquées dans les processus de méthylation *de novo* de la chromatine ou de modifications des histones (méthylation et acétylation).

Pris ensemble, les analyses réalisées suggèrent que ce cluster regroupe les gènes exprimés préférentiellement par des spermatogonies en division.

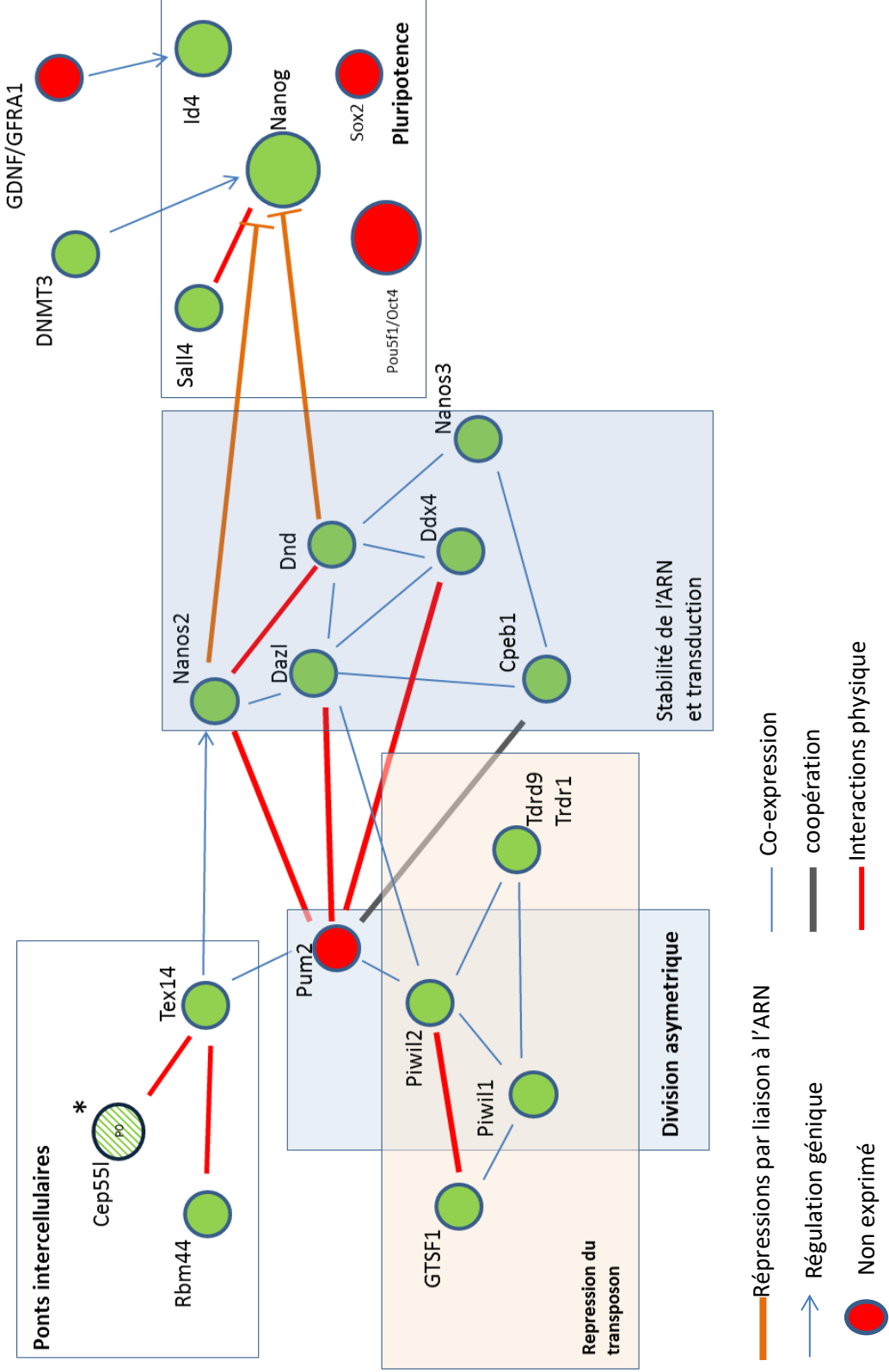
#### **Cluster P5 :**

Le cluster P5 regroupe des transcrits préférentiellement exprimés dans les spermatogonies par rapport aux cellules de Sertoli triées. Ces gènes sont spécifiques de la lignée germinale, car leur expression n'est plus détectée dans les testicules dépourvus en cellules germinales. Contrairement au cluster P4, l'abondance relative de ces transcrits est importante dans les testicules des animaux sexuellement matures. De plus, l'abondance relative des transcrits varie peu entre les cellules spermatogoniales triées et la fraction cellulaire prélevée avant le tri. Pris ensemble, nos observations suggèrent que ces transcrits sont accumulés dans les spermatogonies, mais aussi dans les cellules germinales plus avancées dans la différenciation spermatique (spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes).

De manière intéressante, l'analyse des annotations liées aux protéines codées par les transcrits du cluster P5, met en avant un enrichissement des termes associés à la prolifération cellulaire (cycle cellulaire, mitose, réparation de l'ADN), mais plutôt en lien avec la méiose (division méiotique, ségrégation des chromosomes méiotiques, réparation des cassures double brin). On note également l'enrichissement des termes associés à la morphogénèse des structures ciliées, au transport de protéines le long des microtubules et à l'empaquetage de l'ADN (figure 48). Ces gènes sont clairement impliqués dans la formation du flagelle et dans le remodelage des protéines de liaison à l'ADN au cours de la spermiogénèse. Ce cluster P5 révèle que la cellule spermatogoniale a déjà un statut permissif pour la mise en place de processus tardifs de prolifération et de différenciation des cellules germinales.

#### **Cluster P6 :**

Ce cluster regroupe des transcrits exprimés dans les spermatogonies, mais aussi dans des cellules somatiques à l'exception des cellules de Sertoli. En effet,



**Figure 49 : Représentation schématique des interactions existant entre certains gènes du cluster P4.** Les nœuds verts représentent des gènes exprimés dans les données transcriptomique alors que les nœuds rouges ne le sont pas. Chaque gène est représenté dans un cadre correspondant au processus auquel il intervient. Les connaissances scientifiques actuelles permettent de relier ces différents gènes en fonction de leurs interactions (co-expression, coopération, interaction physique, répression...).



l'expression de la plupart de ces transcrits est détectée dans les testicules d'animaux dépourvus de cellules germinales. Contrairement aux clusters P4 et P5, on note très peu d'enrichissement de termes fonctionnels. Les transcrits sont impliqués dans de nombreux processus métaboliques des lipides et des glucides (figure 48).

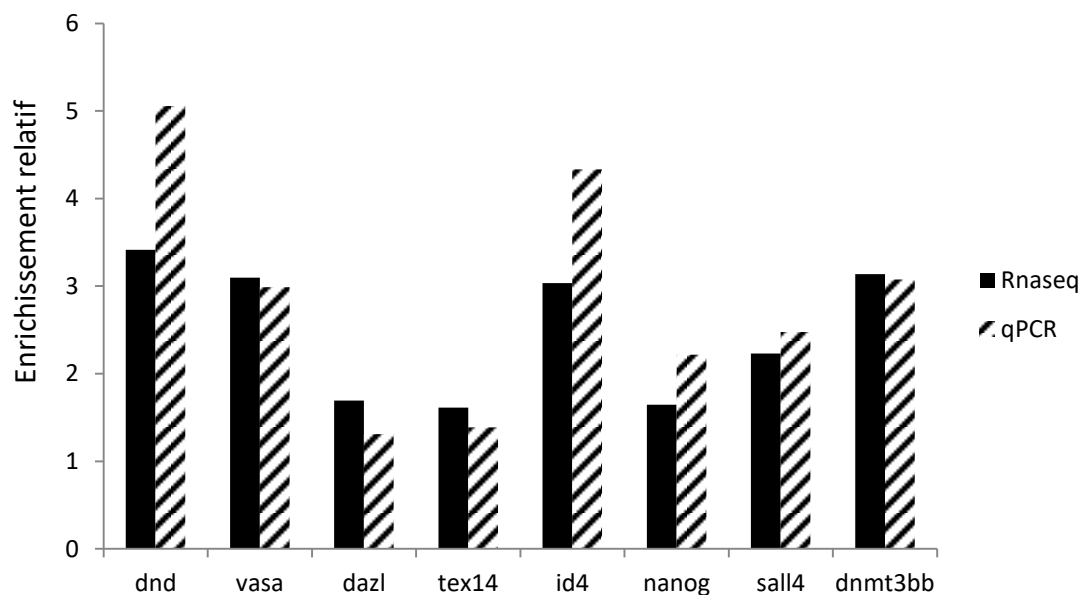
En résumé, l'analyse des clusters P4 et P5, montre que le transcriptome des cellules germinales purifiées, correspond bien à des spermatogonies. Cependant, nous avons approfondi l'analyse de ce transcriptome pour déterminer à quel point il pouvait être compatible avec celui d'une cellule spermatogonale indifférenciée voire de cellules souches spermatogoniales.

## **2. Le transcriptome des cellules spermatogoniales purifiées est cohérent avec celui des spermatogonies de type Apr et des SSC des mammifères.**

Parmi les 15968 transcrits identifiés par le séquençage à haut débit et dont les niveaux d'expression sont supérieurs à 3fpkm, nous avons pu distinguer un cluster P4 qui représente 2266 transcrits très enrichis dans les spermatogonies fluorescentes purifiées, spécifiques des cellules germinales et présents en faible abondance dans les testicules d'animaux sexuellement matures. Ce cluster P4 reflète en quelque sorte la signature moléculaire la plus spécifique des cellules purifiées. Ce cluster montre une expression très abondante de nombreux transcrits codant pour des protéines de liaison aux ARN et très majoritairement exprimées dans les PGC, les gonocytes et les spermatogonies comme *ddx4* (*vasa*), *dazl*, *dnd*, *piwi1*, *piwi2*, *cpeb1a*, *tudor 1* et *9*, *nanos3* et *gtsf1*. On retrouve aussi la présence de transcrits codant pour des protéines impliquées dans la structure de ponts intercytoplasmiques comme *rbm44* et *tex14* (figure 49). Cette dernière observation suggère que les cellules purifiées ne sont probablement pas uniquement des spermatogonies isolées, mais qu'elles forment des ponts intercytoplasmiques.

Nous avons démontré précédemment, par hybridation *in toto*, que le gène *dnd* est exprimé dans des doublets de spermatogonies indifférenciées similaires aux spermatogonies interconnectées de type Apr décrites chez les mammifères. Les données d'expression obtenues par RNASeq montrent que l'abondance relative des transcrits *dnd* fait partie des plus élevées et de celles qui augmentent le plus en

### Cellules *vasa*:eGFP triées



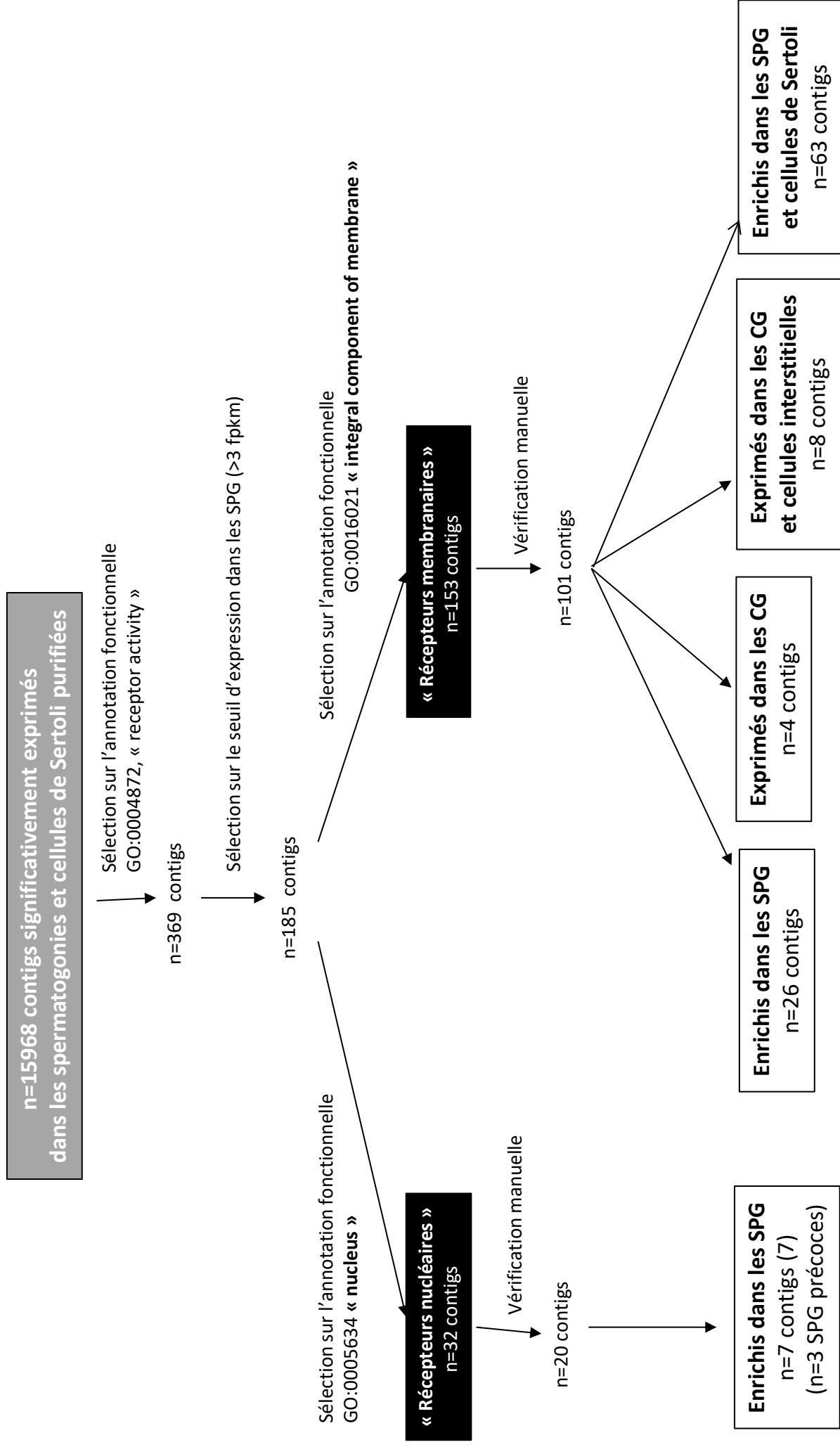
**Figure 50 : Enrichissement des gènes d'intérêt observé en qPCR et Rnaseq.**

L'enrichissement est calculé en faisant le rapport d'expression entre cellules fluorescentes purifiées et cellules non triées. Il n'y a pas de différence significative entre les données Rnaseq et qPCR d'après un test T de student avec intervalle de confiance de 95%

proportion dans les cellules fluorescentes purifiées par rapport aux cellules non triées (enrichissement d'un facteur 3,5 contre 2,8 et 1,5 pour *vasa* et *dazl* respectivement). Cet enrichissement, défini par l'analyse transcriptomique, est en accord avec nos données d'analyse qPCR (figure 50). Les facteurs d'enrichissement plus modestes obtenus pour les transcrits *vasa* et *dazl* sont en accord avec leur profil d'expression étendu à toutes les spermatogonies voire les spermatocytes primaires pour le transcrit *dazl*. En conséquence, les profils d'expression des transcrits *dnd* et *tex14* suggèrent que la fraction spermatogoniale purifiée est particulièrement enrichie en cellules de type Apr.

Afin de préciser la nature des cellules spermatogoniales purifiées, nous avons recherché la présence de transcrits codant pour des marqueurs de SSC dans le transcriptome de ces cellules (figure 49). On observe un enrichissement très marqué du transcrit *id4* (facteur 3), qui code pour un marqueur reconnu des SSC chez les mammifères. De plus, les transcrits *nanog* (facteur 1.6), mais surtout *Sall4* (facteur 2.2) et *dnmt3bb* (facteur 3.1) sont aussi nettement enrichis dans les cellules spermatogoniales purifiées (figure 50). Les protéines Nanog et Sall4 sont impliquées dans le maintien de l'état de multipotence de nombreuses cellules souches embryonnaires et adultes, incluant les SSC. Chez les mammifères, ces gènes sont exprimés dans les spermatogonies A indifférenciées formant le pool de SSC. Le co-enrichissement important des transcrits *nanog*, *sall4* et *dnmt3ba* dans les spermatogonies purifiées suggère que ces cellules sont bien des SSC, mais celles-ci pourraient avoir initié un switch épigénétique qui les oriente vers un processus de différenciation. Il a été montré que les protéines Sall4 et Nanog interagissent pour conférer aux cellules souches leurs caractéristiques de cellules multipotentes. Cependant, la méthyle transférase DNMT3b, qui est responsable de la méthylation *de novo* des promoteurs des gènes de multipotence *nanog* et *oct 4*, est connue pour réguler négativement l'expression des transcrits *nanog* lors de la différenciation des gonocytes. Cette répression de l'expression du gène *nanog* pourrait être renforcée par la forte expression des transcrits *dnd*. En effet, *dnd* se lie aux transcrits *nanog* pour en réduire la traductibilité.

Nous avons analysé le profil d'expression d'autres gènes orthologues aux marqueurs des SSC de mammifères comme *thy1a/thy1b* (orthologues de *thy1*), *pou2* (orthologue de *Pou5F1/oct*), *sox2* ou encore *gfra1a/gfra1b* (orthologues de *gfra1*)



**Figure 51 : Stratégie de sélection des récepteurs exprimés dans les spermatozoies purifiées.**

Les gènes correspondant aux contigs issus du séquençage et montrant un seuil d'expression supérieure à 3fpkm dans les spermatozoies ont été annotés en fonction des domaines protéiques fonctionnels déduits de ces gènes. L'interrogation de cette base de données avec des termes spécifiques comme « récepteur nucléaire » ou récepteur membranaires », suivis d'une curation manuelle, a permis d'identifier de nombreux transcrits enrichis dans les différents types cellulaires étudiés. SPG : Spermatozoies, CG : Cellules germinales

que nous n'avons pas détecté précédemment en qPCR. Là encore, les données de RNAseq confirment nos résultats préliminaires puisque l'on ne détecte aucune expression significative ( $>3$  fpkm) de ces transcrits dans la fraction spermatogoniale purifiée (figure 49).

En résumé, les cellules spermatogoniales fluorescentes purifiées chez le poisson-zèbre sont probablement en majorité des spermatogonies A indifférenciées de type Apr. Leur transcriptome est similaire, mais pas identique, à celui des SSC de mammifères.

### **3. Recherche de nouvelles voies de régulations paracrines du devenir des cellules spermatogoniales indifférenciées**

Le fait de posséder des informations sur l'expression des gènes dans les cellules de Sertoli et dans les spermatogonies indifférenciées de type Apr nous a permis d'essayer d'identifier de nouvelles voies de régulations paracrines impliquées dans le devenir des spermatogonies Apr et donc dans la dynamique de renouvellement du pool de SSC.

La stratégie que nous avons mise en œuvre pour proposer de nouvelles voies de régulation paracrine du devenir des cellules spermatogoniales indifférenciées est illustrée sur la figure 51. Nous avons d'abord recherché dans le panel de 15968 transcrits, ceux qui étaient annotés avec le terme du gene ontology correspondant aux protéines ayant une activité de récepteurs (369 transcrits), puis nous avons restreint notre sélection aux gènes exprimés significativement (seuil d'expression  $> 3$  fpkm) dans la fraction de cellules spermatogoniales purifiées (185 transcrits). Nous avons ensuite distingué les récepteurs nucléaires (32 transcrits) et les récepteurs intégrés aux membranes (153 transcrits). Une curation manuelle des données a permis d'éliminer les transcrits codant pour des protéines possédant une activité enzymatique et associées aux membranes des lysosomes, du réticulum endoplasmique, ou de l'appareil de Golgi. Cette curation manuelle a permis de restreindre le nombre de transcrits codant pour des récepteurs nucléaires d'intérêt à 20 (figure 51). De même, le nombre de transcrits codant pour des récepteurs membranaires potentiellement présents à la surface des cellules a été restreint à 101 (figure 51).

GeneName	ID	Ligand	Group	SE	SPG	NT	MO	WT	Testis	Ovary	Bone	Brain	Gills	Heart	Intestini	Kidney	Liver	Muscle	Unfert	Embryo
nr6a1b	TCONS_00077241	orphan receptor, germ cell dyp	P4	2.1	5.31	2.72	2.66	3	6.79	0.19	3.68	5.91	11.9	11.71	17.16	5.52	5.8	7.84	0	2.94
lorca	TCONS_00146055	orphan receptor, retinoic acid	P6	0.01	4.33	2.05	0.92	0.63	2.34	0	6.6	16.69	17.53	14.84	9.4	10.51	11.61	3.88	0	1.66
rx9a	TCONS_00065156	retinoic acid	P6	2.19	4.47	3.01	5.97	184	4.42	5.17	4.74	6.7	9.03	6.39	6.17	0	9.12	6.77	9.97	10.77
nr2c2	TCONS_00144887	orphan receptor, retinoic acid	P4	1.03	4.76	3.85	1.82	3.82	3.8	6.64	5.88	7.58	6.72	8.2	9.38	13.27	17.6	5.27	3.61	4.11
nr6a1a	TCONS_00147834	orphan receptor, germ cell dyp	P4	0.56	4.83	2.88	0.89	4	4.78	2.81	8.95	13.48	16.88	20.08	12.49	18.35	17.03	14.04	0.57	6.17
pparda	TCONS_00082357	lipid-derived substrates	P6	2.47	6.13	4.16	12.52	3.77	108	3.47	53.11	2.87	4.74	54.09	1.19	157	0.25	12.64	3.02	1.47
nr2f2	TCONS_00056596	orphan receptor, retinoic acid	P5	1.33	8.02	8.05	2.73	10.91	3.03	16	148	1.74	0.76	2.18	2.18	3.86	4.5	5.44	2.5	4.35

**Tableau 12 : Récapitulatif des récepteurs nucléaires enrichis dans les spermatogonies**

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C : coeur, I : intestin, R : Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisée

GeneName	ID	Ligand	Group	SE	SPG	NT	MO	WT	Testis	Ovary	Bone	Brain	Gills	Heart	Intestini	Kidney	Liver	Muscle	Unfert	Embryo
nr3c1	TCONS_00032770	glucocorticoid	P0	6.87	10.41	5.11	22.2	9.17	0.98	0.27	1.17	1.97	1.93	3.62	2.99	1.93	2.89	1.6	0.96	2.21
ppardb	TCONS_00143289	lipid-derived substrates	P0	5.21	7.01	6.8	5.96	5.01	189	1.49	0.21	0.09	0.02	0.01	0.02	0.02	0.04	0.11	6.61	5.19
nr2f6a	TCONS_00065426	orphan receptor	P0	11.61	6.53	7.82	2.22	3.96	0.65	0.02	2.25	7.37	5.88	10.55	3.11	1.23	16.22	3.36	0	0.9
nr4a1	TCONS_00093301	orphan receptor	P3	37.35	5.07	6.45	1.63	2.43	3.11	3.34	2.16	4.14	3.7	2.85	3.46	2.32	6.76	3.15	0.03	11.53
nr1d2b	TCONS_00059409	orphan receptor, repressor	P3	7.75	3.6	7.82	6.43	6.46	4.07	3.13	2.55	4.16	4.1	3.41	3.97	4.28	5.04	2.94	1.36	6.06
nr1h3	TCONS_00140021	orphan receptor, heterodimer with rxr	P0	9.22	7.79	11.34	6.34	6.53	5.01	3.2	3.44	3.82	7.62	5.19	3.79	4.53	6.78	3.57	0.25	4.9
nr1d2b	TCONS_00059408	orphan receptor, repressor of ror	P0	4.68	7.29	9.28	1.94	7.2	3.51	1.47	2.91	7.4	5.61	3.97	4.44	4.57	5.52	3.04	3.58	1.38
nr2c1	TCONS_00117335	orphan receptor, retinoic acid	P0	4.91	6.02	6.9	3.39	4.56	2.54	0.73	0.7	0.64	1.73	1.22	1.22	2.64	24.36	0.84	0.06	0.45
rorcb	TCONS_00067153	orphan receptor, retinoic acid	P0	3.17	3.68	2.67	9.53	3.23	163	2.79	1.98	3.52	5.08	0.48	9.4	0	0.01	4.94	151	108
rxbbb	TCONS_00040965	retinoic acid	P0	12.15	6.99	20.28	16.48	16.65	159	0.16	3.87	0.45	0.81	2.19	3.58	3.69	6.99	6.89	0	2.03
rxba	TCONS_00061623	retinoic acid	P0	11.02	4.7	10.24	3.46	4.99	7.37	4.44	3.04	6.07	1.33	0.89	0.79	2.6	2.8	2.66	0	1.48
rxba	TCONS_00061627	retinoic acid	P1	8.72	3.05	8.12	8.45	7.21	10.83	1.98	8.89	13	10.12	10.29	7.39	118	16	16.76	2.32	2.7
vdrb	TCONS_00132269	vitamin D3	P0	3.75	5.54	4.75	9.35	3.93	147	0.04	0.21	0.22	1.39	0.3	0.64	0.19	0	0.07	0.15	5

**Tableau 13 : Récapitulatif des Récepteurs nucléaires exprimés dans les spermatogonies et les cellules de Sertoli**

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C : coeur, I : intestin, R : Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisée

### **3.1. Analyse des récepteurs nucléaires**

Notre approche analytique révèle la présence de 20 récepteurs nucléaires exprimés au sein des cellules spermatogoniales fluorescentes purifiées (tableau 12 et 13). L'expression de ces récepteurs dans les spermatogonies indifférenciées de poisson-zèbre constitue une information originale à ce jour.

On retrouve les deux orthologues (*rxrba*, et *rxrbb*) du récepteur de l'acide rétinoïque *rxrb* et surtout un des orthologues (*rxrga*) du récepteur Rxr gamma qui est enrichi dans les spermatogonies (tableau 12 et 13). Ce récepteur Rxr gamma est impliqué chez les mammifères dans le maintien du statut souche des SSC en absence de l'acide rétinoïque. De nombreux autres récepteurs (12 sur 20), connus pour fixer l'acide rétinoïque à forte dose, sont présents dans la sélection, mais ils restent classés dans les récepteurs orphelins, car leur ligand physiologique est inconnu (tableau 12 et 13). Trois des transcrits, correspondants à ces récepteurs, sont particulièrement enrichis dans les spermatogonies purifiées (*rorca*, *nr6r1a*, *nr6r1b*). Les transcrits *nr6a1a* et *nr6a1b* codent pour des récepteurs orthologues au récepteur mammalien NR6A1, également appelé GCNF (Germ Cell Nuclear Factor). Chez les mammifères, l'expression de ce récepteur est observée dans les cellules germinales souches et elle est corrélée avec celles des gènes de multipotence *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* et *Stra8*. L'expression de ce récepteur nucléaire est nécessaire à la différenciation des SSC de souris (Sabour et al., 2014).

D'autres récepteurs nucléaires, qui se lient à des dérivés du métabolisme des lipides, sont exprimés dans les spermatogonies purifiées. Il s'agit des récepteurs aux glucocorticoïdes et à la vitamine D3 pour ce qui est du métabolisme du cholestérol (tableau 13). La stimulation du récepteur de la vitamine D3 chez les mammifères réprime l'expression de *Nanog* et de *Oct4* (Blomberg Jensen et al., 2012). Les deux orthologues (*Pparda* et *Ppardb*) du récepteur mammalien PPAR delta fixent des dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique.

En résumé, l'analyse des récepteurs nucléaires fait apparaître que les spermatogonies indifférenciées isolées chez le poisson-zèbre pourraient être sensibles à de nombreux métabolites, dont certains, sont déjà connus pour réguler le devenir des SSC chez les mammifères (acide rétinoïque).

GeneName	ID	Ligand	Groupe	SE	SPG	NT	MO	WT	T	Ov	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
si:ch211-200o1.1 GPR144 like	TCONS_00084027	Cell adhesion molecule	P4	0,41	6,19	3,36	0,67	2,61	2,01	0	0,19	0,15	0,03	0,1	0,02	0	0,05	0	0,15	0
cadm1a	TCONS_00078167	Cell adhesion molecule, homophilic	P0	3,39	5,86	2,53	2,52	2,6	2,77	0,13	2,35	20,84	5,26	3,16	0,55	0,41	0,78	0,2	1,41	0,25
cadm1a	TCONS_00078166	Cell adhesion molecule, homophilic	P4	2,52	5,83	3,7	0	2,37	2,21	0,29	1,31	9,63	5,96	1,09	0	0,24	0,55	0	0	0
si:key-30c15.2 TMEM116	TCONS_00055744	Cell adhesion molecule	P4	0,25	4,32	1,38	0,97	1,67	0,79	0,3	0,87	0,02	0,08	12,44	0,02	61,19	2,33	1,9	0,3	0,6
pvr11a	TCONS_00080815	Cell adhesion molecule, viral glycoprotein D	P4	0	3,18	0,57	0	0,12	0,69	0,16	0,33	0,46	0,27	0,03	0,04	0,15	0,15	0	0,1	0,56
ptprub	TCONS_00045270	Cell adhesion molecule	P4	0,07	3,43	1,62	2,3	2,33	3,9	0,65	0,67	6,35	0,93	2,44	0,82	0,23	0,53	0,08	0,7	0,29
pr2y4l	TCONS_00033355	Cyokine, cxcl12 (SDF-1), UTP/UDP	P4	0,93	3,79	1,19	1,11	1,83	0,59	0,07	0,88	0,17	0,95	0,96	1,11	29,94	2,2	6,82	1,86	0
il2rgb	TCONS_00033219	Cyokine, interleukin 2, 4, 7 and 21	P0	2,84	5,23	5,12	0,89	3,63	2,32	10,07	4,18	2,52	4,47	2,45	3,16	2,9	5,03	5,1	7,17	2,33
crfb17	TCONS_00002990	Cyokine, unknown	P0	3,5	5,6	5,44	1,05	2,59	1,67	0,06	0,36	0,05	0,85	11,51	0,09	11,46	0,35	0,09	0,3	0,08
hdr	TCONS_00120421	Cyokine, TNF	P4	0,69	6,47	3,78	1,55	4,32	3,49	13,7	6,2	0,3	5,05	6,27	3,42	6,36	28,48	0,38	3,43	290,2
ccr6a	TCONS_00072260	Cyokine, MIP3a	P4	0,78	4,25	2,08	0,43	1,44	3,39	3,02	1,56	2,2	1,02	2,83	1,01	1,89	1,8	0,09	1,68	7,45
tgfb3	TCONS_00145471	Cyokine, TGF beta 3	P6	0,49	4,06	2,24	3,52	1,9	1,44	0,63	1,37	11,77	4,6	1,44	0,19	0,53	0,38	0,04	1,85	2,39
tgfb2	TCONS_00045510	Cyokine, TGF beta members	P4	0,13	3,47	0,92	0	2,49	2,3	5,41	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0,69	0,11
il20ra	TCONS_00070659	Cyokine, Interleukin 20	P4	0,31	3,55	2,63	0,5	3,33	2,74	0,05	0,18	0,02	1,09	3,73	0,02	11,73	0,57	0,21	0,13	0,28
ednra	TCONS_00005274	Growth factor, endothelin	P4	0,47	4,56	1,74	1,1	1,79	0,8	0	0,89	0,39	2,54	0,13	0	0,19	0,14	0	0,36	0,15
galr1b	TCONS_00140057	Growth factor, galanin	P4	0,1	3,23	1,03	0,77	1,81	0,94	0	0,79	1,16	0,21	0,06	0,03	3,51	1,13	0	0,55	0
gpr37a	TCONS_00100826	Growth factor, prosaposin	P4	0,46	3,56	1,55	0,54	1,33	0,37	0,02	1,76	2,71	0,46	0,22	0,04	0,11	0,13	0	4,97	0
fzd9b	TCONS_00057574	Growth factor, wnt	P6	1,16	3,16	1,36	1,47	0,94	0,42	0,2	0,5	2,75	4,17	2,64	8,95	0,02	0,16	0	1,5	0,14
P2RY1 like	TCONS_00090014	Metabolite, extracellular ADP and ATP	P4	2,17	5,95	2,04	0,77	1,81	0,9	0,05	0,72	0,12	0,06	2,91	0,83	1,93	3,52	0,36	0,39	0,32
gpbar1	TCONS_00150628	Metabolite, bile acids	P0	2,04	3,63	2,63	1,79	2,12	0,26	0,12	0	0,49	0,13	0,12	0,14	0,72	3,44	0,42	0	0
ptafr	TCONS_00050561	Metabolite, phosphorylcholine	P6	0,9	3,39	1,45	1,84	1,25	0,32	0,01	2,41	0,13	0,16	2,72	0,31	0,42	2,22	0,09	0,8	0
npr1a	TCONS_00059845	Natriuretic peptide	P4	0,12	3,84	2,67	0	2,64	0,95	0,26	0,33	1,25	0	0,26	0,06	1,13	0	0	0	0,3
gpr63	TCONS_00070574	Orphan receptor	P4	0,58	4,53	1,65	0	2,66	2,76	6,19	2,45	12,36	1,37	0,66	0,57	0,43	0,19	0,61	1,94	12,74
BX324188.1 gpr161 like	TCONS_00024832	Orphan receptor	P4	0	4,83	1,94	0	2,8	3,67	0,17	0,15	0,16	0,05	0,01	0	0	0	0	0	0,22
gpr161	TCONS_00149936	Orphan receptor	P6	0,27	4,05	1,32	1,34	0,96	0,39	7,01	1,93	0,73	6,42	0,46	0,65	0,16	0,81	1,48	1,81	2,92
parapinopsinb	TCONS_00014292	Photosensible	P4	0,39	6,74	2,64	0,15	1,65	1,91	1,5	1,33	13,95	0,55	0,15	0,1	0,3	0,03	0	1,04	0,61

**Tableau 14: Récapitulatif des Récepteurs membranaires préférentiellement exprimés dans les spermatogonies indifférenciées**

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C : coeur, I : intestin, R : Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisé



GeneName	ID	Ligand	Groupe	SE	SPG	NT	MO	WT	T	Ov	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
adgrg9	TCONS_00003073	Cell adhesion molecule	P5	0,59	4,16	3,14		6,51	6,46	0,07	0	0	0,04	0,36	0	0	0,09	0	0	0
ifnlr1	TCONS_00042839	Cytokine, Interféron	P5	0,05	5,01	2,41	0,23	6,22	3,92	2,43	1,73	0,58	0,29	1,29	0,6	7,4	0,08	0,79	2,43	4,27
ADORA3	TCONS_00129849	metabolite, extracellular ATP and ADP	P0	0	3,64	4,14	0,46	8,88	5,53	1,12	0,47	0	0,03	0,04	0	0	0,06	0	0,28	0,23
opn1sw2	TCONS_00013832	Photosensible	P0	0,95	3,21	2,41	0	26,39	30,17	0,79	0,2	0,06	0,43	0,78	0,03	0,13	0	0,2	0,15	143

### Tableau 15 : Récapitulatif des Récepteurs membranaires exprimés préférentiellement dans les cellules germinales tardives

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C : coeur, I : intestin, R: Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisée

GeneName	ID	Ligand	Groupe	SE	SPG	NT	MO	WT	T	Ov	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
adgrg4b	TCONS_00008740	Cell adhesion molecule	P6	2,17	8,46	6,25	5,1	4,56	5,51	4,5	3,43	2,91	4	4,92	4,37	0,87	3,55	9,34	4,25	16,71
anbx2b	TCONS_00007707	Cell adhesion molecule, collagen IV and laminin	P6	0,35	6,48	2,12	4,86	4,08	2,13	0	2,16	2,26	0,48	0,86	0,03	2,24	0,55	3,84	2,25	0
acw2aa	TCONS_00152477	Cytokine, TGF beta members	P0	3,64	7,05	6,28	1,18	5,77	3,88	4,99	4,94	9,94	3,21	0,65	5,56	5,04	5,75	5,26	7,45	0,61
acw2b	TCONS_00098959	Cytokine, TGF beta members	P6	3,13	7,93	6,35	4,81	4,55	2	2,92	0,71	0,66	4,16	0,34	0,38	0,87	0,23	1,56	0,85	6,99
insra	TCONS_00069354	Growth factor, Insulin	P0	3,67	5,17	4,39	0,41	4,42	3,34	7,76	5,18	5,61	2,83	1,73	6,63	2,1	4,01	7,9	5,39	41,6
GPR161 (2 of 2)	TCONS_00127371	Orphan receptor	P6	169	4,2	3,87	8,57	6,13	4,06	0,01	0,6	0,43	7,36	5,32	0,41	0,34	1,91	3,53	0,77	0
GPR152	TCONS_00003470	Orphan receptor	P5	12	5,56	6,12	3,79	9,23	5,72	2,25	1,64	0,87	1,78	3,94	0,52	1,24	1,16	0,22	1,73	5,7
paq7b	TCONS_00042106	Steroid, Progesterone	P0	3,12	4,07	4,57	5,32	3,22	1,75	0,02	5,71	24,23	0,76	1,91	0,73	0,59	0,26	0	1,96	0,04

### Tableau 16 : Récapitulatif des Récepteurs membranaires exprimés par les spermatogonies et cellules interstitielles

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C : coeur, I : intestin, R: Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisée

### **3.2. Analyse des récepteurs membranaires**

L'analyse des données de RNAseq fait ressortir 101 transcrits codant pour des récepteurs membranaires potentiellement localisés sur la membrane plasmique. Ces derniers ont été classés en 4 groupes selon leur spécificité cellulaire déduite des données de RNAseq (tableau 14 à 18).

#### **Groupe 1 : Récepteurs membranaires préférentiellement exprimés dans les spermatogonies indifférenciées isolées (tableau 14)**

Le premier groupe contient 26 transcrits dont l'abondance relative est fortement augmentée dans les cellules spermatogoniales fluorescentes isolées. Ces transcrits sont majoritairement d'origine germinale, car leur expression est fortement diminuée dans les gonades mâles dépourvues de cellules germinales (tableau 14).

Six de ces transcrits codent pour des récepteurs couplés aux protéines G appartenant à la superfamille des immunoglobulines (tableau 14). Ces molécules sont impliquées dans les processus de reconnaissance et d'adhérence cellulaire. Le transcrit *cadm1a*, qui fait partie des plus exprimés de ce groupe, code pour une protéine orthologue de CADM1. Cette protéine est exprimée par les spermatogonies intermédiaires et les spermatozoïdes allongés chez la souris (Wakayama and Iseki, 2009). Elle est impliquée dans l'adhésion entre cellules germinales d'une part et entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli d'autre part. L'un de ces ligands serait un récepteur à poliovirus. De manière intéressante, l'un de ces récepteurs (*Pvr11a*) est aussi présent dans cette même liste de récepteurs.

Huit transcrits codent pour des récepteurs aux cytokines de la famille des TGF beta, des interleukines et Cxcl notamment (tableau 14). En particulier, nous pouvons noter l'expression significative du transcrit codant pour le récepteur gamma à l'interleukine 2. Cette cytokine est connue pour stimuler la prolifération des PGC chez la souris (Eguizabal et al., 2007). Quatre autres transcrits, codants pour d'autres facteurs de croissance (endothéline, galanine, prosaposine, wnt), viennent compléter ce groupe. Il faut noter que seuls les transcrits codant pour l'endothéline 2 et la prosaposine sont détectés dans les cellules de Sertoli de poisson-zèbre (tableau 14).

GeneName	ID	Ligand	SE	SPG	NT	MO	WT	T	Ov	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
adiopor1a	TCONS_00013754	Cytokine, Adiponectin	29,46	12,49	30,48	13,35	21,92	13,49	23,39	16,39	20,52	4,05	14,59	20,27	6,61	23,55	6,36	16,78	21,22
adiopor1b	TCONS_00143614	Cytokine, Adiponectin	10,96	8,89	12,7	7,71	6,47	5,04	10,95	6,96	10,59	4,75	11,74	6,56	11,13	10,09	20,54	7,62	40,03
adiopor1b	TCONS_00143615	Cytokine, Adiponectin	6,56	6,16	5,75	4,12	2,86	3,52	8,38	5,92	5,87	4,91	11,3	4,81	14,39	0	15,49	6,72	56,56
adiopor2	TCONS_00112171	Cytokine, Adiponectin	53,7	9,66	47,07	21,45	26,12	30,07	11,73	16,22	9,36	5,15	33,08	46,67	31,72	28,21	17,59	17,38	9,35
paqr3a	TCONS_00125180	Cytokine, Adiponectin	10,54	12,93	14,38	5,35	13,82	8,67	9,31	3,55	3,13	3,75	3,35	2,78	1,7	3,17	3,51	3,73	149,81
paqr3b	TCONS_00007711	Cytokine, Adiponectin	7,46	6,88	9,38	4,38	3,47	2,29	0,31	0,68	3,17	3,87	0,98	2,38	1,68	1,71	4,07	0,89	0
paqr7b	TCONS_00042106	Cytokine, Adiponectin	3,12	4,07	4,57	5,32	3,22	1,75	0,02	5,71	24,23	0,76	1,91	0,73	0,59	0,26	0	1,96	0,04
il1f10rb	TCONS_00150980	Cytokine, interleukin, IL10	10,48	4,34	7,45	5,37	1,4	1,42	1,79	6,23	6,61	2,37	6,9	4,8	7,74	6,1	6,44	13,08	0,33
il1f2rga	TCONS_00011843	Cytokine, interleukin, IL2R, ILR4, ILR7, ILR21	4,1	3,72	6,7	7,79	3,23	1,28	0,01	8,21	1,55	0,43	15,89	6,33	14,75	29,14	2,59	3,6	0
il1f4r.1	TCONS_00110560	Cytokine, interleukin, IL4, IL13	40,83	6,55	26,78	9,93	2,64	1,18	0,1	1,84	0,27	0,19	9,07	2,6	2,8	9,64	4,74	1,14	0,68
cxcr3.3	TCONS_00040650	Cytokine, chemokine, cxcl4, cxcl8, cxcl10, cxcl11	17,25	9,49	16,67	3,65	2,49	0,82	0,02	1,98	0,46	0,5	5,44	2,78	4,11	7,86	8	1,97	0
crfb1	TCONS_00148820	Cytokine, interferon	4,78	4,87	4,34	1,77	2,82	2	0,23	0,45	0,13	0,45	0,43	1,35	0,58	4,88	0,01	0,56	0
crfb1	TCONS_00148819	Cytokine, interferon	5,11	3,76	4,13	2,85	3,76	1,22	0,23	1,49	2,89	0,55	4,05	2,56	3,41	2,41	2,86	0,97	0
crfb2	TCONS_00152060	Cytokine, interferon	8,44	4,13	7,23	3,89	3,57	1,78	0,03	1,6	3,3	0,38	4,02	2,79	3,59	4,38	2,41	2,44	0,11
crfb6	TCONS_00125626	Cytokine, interferon	41,33	24,76	39,94	19,48	22,41	11,28	20,69	12,46	18,27	5,28	17,79	16,07	23,55	13,99	11,84	12,14	2,29
acvr2aa	TCONS_00152477	Cytokine, TGF beta member	3,64	7,05	6,28	11,18	5,77	3,88	4,99	4,94	9,94	3,21	10,85	5,56	5,04	5,75	5,26	7,45	0,61
bmpr1bb	TCONS_00009982	Cytokine, TGF beta member, co-receptor	5,64	4,77	4,93	12,87	3,85	4,33	1,42	0,72	1,82	1,45	0,24	0,1	0,05	0,02	0	0,73	22,31
acvr1ba	TCONS_00093007	Cytokine, TGF beta member, co-receptor	12,2	4,05	8,89	6,16	5,32	4,65	8,17	8,24	11,04	6,41	15,52	13,3	4,32	5,76	2,4	12,66	159,91
acvr1ba	TCONS_00093006	Cytokine, TGF beta member, co-receptor	10,33	3,48	5,59	0,71	2,11	0,71	3,21	1,61	1,44	4,19	5,31	0,25	0	0,87	0,75	2,88	36,99
bmpr1ab	TCONS_00021375	Cytokine, TGF beta member, co-receptor	13,78	3,21	7,49	8,46	2,44	1,58	2,58	2,73	3,69	7,39	6,19	12,6	2,88	0,86	0,38	3,32	0,25
tgfb1a	TCONS_00068639	Cytokine, TGF beta member, co-receptor	4,18	6,92	5,79	4,09	3,85	2,03	0,13	0,88	1,77	3,01	3,74	0,63	1,24	3,47	14,51	1,68	0,19
cd40	TCONS_00093692	Cytokine, TNF	101,71	10,2	59,93	14,43	9,26	3,3	0,03	12,54	7,73	0,5	14,5	19,03	20,14	30,7	6,01	9,74	0
relt	TCONS_00055461	Cytokine, TNF	3,71	3,56	5,25	1,32	4,17	2,06	0,05	0,66	1,76	0,92	0,46	0,44	0,4	0,99	0	1,94	0,32
tnfrsf1a	TCONS_00044058	Cytokine, TNF	65,1	6,14	57,92	19,73	4,47	2,18	0,09	6,26	1,8	2,5	23,02	28,36	17,69	21,29	5,97	4,09	0
tnfrsf1a	TCONS_00080396	Cytokine, TNF	48,76	9,53	25,65	12,16	7,38	3,63	4,55	4,65	2,86	3,5	26,65	24,4	5,67	5,79	5,65	6,51	6,07
il1ra	TCONS_00123140	Cytokine, LIF	15,14	6,63	10,42	19,36	7,16	1,28	0,25	1,37	4,71	2,52	2,2	3,16	0,62	2,23	5,71	0,86	1,86
il1rb	TCONS_00078026	Cytokine, LIF	46,11	5,29	23,08	32,76	6,48	2,82	9	6,4	0,09	0,56	5,26	0,82	1,47	6,13	1,85	2,99	0

**Tableau 17: Récepteurs membranaires préférentiellement exprimés dans les Cellules de Sertoli et spermatogonies (1/2)**

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C : coeur, I : intestin, R : Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisée

Trois transcrits codent pour des récepteurs à des métabolites comme l'ATP/ADP extracellulaire (P2ry1b), la phosphorylcholine (Ptafr), ou les acides biliaires (Gpbar1). On peut noter que l'ATP extracellulaire a déjà été démontré comme étant un métabolite capable de stimuler la prolifération des spermatogonies indifférenciées de truite, en agissant sur deux familles de récepteurs de type A2 et P2 (Loir, 1999b). Cette famille de récepteur P2 inclut les récepteurs Pr2y4l et Pr2y1b (tableau 14).

### **Groupe 2 : Récepteurs membranaires préférentiellement exprimés dans les cellules germinales tardives (tableau 15)**

Le deuxième groupe contient 4 transcrits dont l'expression semble perdurer dans les cellules germinales méiotiques et/ou post-méiotiques (tableau 15). En effet, ces transcrits ne sont pas exprimés dans les cellules de Sertoli ni dans les testicules dépourvus de cellules germinales. Leur expression reste forte dans les testicules des animaux adultes sexuellement matures. Parmi ces récepteurs, on retrouve un récepteur impliqué dans l'adhérence cellulaire (*adgre9*), un récepteur à l'ATP extracellulaire (*adora3*), un récepteur à l'interféron (*ifnlr1*), et un récepteur de type opsine (*opn1sw2*). Le rôle de ces récepteurs dans la biologie des cellules souches reste méconnu.

### **Groupe 3 : Récepteurs membranaires exprimés dans les spermatogonies indifférenciées isolées et dans les cellules interstitielles (tableau 16)**

Ce troisième groupe contient 8 transcrits dont l'expression est observée dans les spermatogonies fluorescentes isolées, mais aussi dans des cellules somatiques autres que les cellules de Sertoli (tableau 16). En effet, l'expression de ces transcrits n'est pas détectée dans les cellules de Sertoli purifiées et elle reste élevée dans les testicules dépourvus de cellules germinales. Ceci suggère qu'une partie des transcrits pourrait être exprimée par les cellules somatiques. On retrouve principalement des récepteurs impliqués dans l'adhérence cellulaire (*adgrg4b*, *antrx2b*), la voie de signalisation de l'insuline (*insra*), des récepteurs de l'activine de type 2 (*acvr2b*, *acvr2aa*), et deux récepteurs orphelins (*GPR161* et *GPR152*). De nombreux ligands potentiels des récepteurs à l'activine de type 2 (*acvr2b* et *acvr2aa*) sont exprimés par les cellules de Sertoli. Il s'agit principalement des sous-unités beta de l'inhibine (*inhbaa* et *inhbb*) qui pourraient former de l'activine B. Cependant, il ne

GeneName	ID	Ligand	SE	SPG	NT	MO	WT	T	Ov	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
fdz6	TCONS_00042927	WNT	6,91	3,73	6,81	9,99	2,09	2,15	2,35	3,6	2,29	5,39	9,03	0,1	4,88	5,61	1,68	3,68	0,06
fdz7a	TCONS_00151784	WNT	5,75	7,02	22,69	101	5,79	2,53	0,71	2,41	2,95	39,63	5,29	2,44	0,44	194	12	3,92	1,26
fdz7b	TCONS_00130683	WNT	2,72	4,67	4,43	3,1	7,3	5,49	9,38	3,91	0,56	4,1	5,77	5,02	2,31	4,8	7,76	4,73	3,31
fdz2	TCONS_00105939	WNT (wnt3a, wnt5a, WNT C22-s ignaling)	5,09	3,34	5,8	6,28	2,99	1,76	5,92	4,27	2,69	4,74	6,05	2,93	2,82	5,13	1,24	7,4	5
igf1ra	TCONS_00056392	IGF	2,93	7,96	7,36	9,94	4,42	2,2	1,4	1,51	4,49	4,82	3,4	3,8	0,56	127	107	1,79	4,66
igf1rb	TCONS_00134361	IGF	7,2	8,17	8,38	7,65	5,65	3,25	2,83	1,69	2,29	1,7	3,53	3,27	0,19	114	0,07	1,4	0,42
insra	TCONS_00069354	Insulin	3,67	5,17	4,39	9,41	4,42	3,34	7,76	5,8	5,61	2,83	1,73	6,63	2,1	4,01	7,9	5,39	9,13
insrb	TCONS_00086156	Insulin	2,37	4,95	8,7	24,87	5,21	2,96	4,06	4,34	6,06	6,29	9,92	0,93	4,36	7,8	1,9	4,31	28,39
epha2a	TCONS_00132755	Growth factor, ephrin	6,02	3,69	6,99	2,85	1,08	0,59	0,14	0,42	0,7	10,66	4,54	1,71	2,67	0,27	0,34	0,41	0,13
ephb4b	TCONS_00091105	Growth factor, ephrin	3,83	4,3	5,16	4,02	3,33	3,12	2,02	1,72	0,59	3,79	2,87	2,76	2,09	2,22	9,25	2,14	0,49
tyro3	TCONS_00048754	Growth factor, growth arrest specific gene 6, protein S	9,32	3,46	4,37	36,28	6	0,7	0,06	0,27	0,89	0,9	0,15	0,22	10,9	0,91	2,95	0,41	0,22
plxna1b	TCONS_00130227	semaphorin	32,3	4,37	9,48	7,54	1,61	0,23	4,6	0,94	1,92	2,93	1,34	1,75	1,41	0,67	0,37	1,36	0,31

GeneName	ID	Ligand	SE	SPG	NT	MO	WT	T	Ov	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
ADGRE5	TCONS_00006953	Cell adhesion molecule	14,1	3,03	10,04	6,45	1,78	2,72	0,11	9,53	2,74	4,08	9,8	6,21	9,15	17,42	2,85	1,96	0,1
adgrg1	TCONS_00139570	Cell adhesion molecule	11,31	3,78	11,57	7,56	12,95	7,3	4,97	1,57	0,81	1,76	5,67	1,48	0,52	1,05	1,32	1,76	2,55
cd276	TCONS_00058074	Cell adhesion molecule	5,54	6,49	31,32	10,79	6,06	4,89	0,19	2,81	1,81	11,08	3,91	2,33	1,4	1,94	0,51	2,41	1
igap2	TCONS_00121592	Cell adhesion molecule	10,06	3,69	13,49	6,18	5,93	2,85	0,07	2,52	0,83	3,02	2,12	5,69	30,43	7,16	13,64	1,18	0,55
si:ch211-222f23.6	TCONS_00151069	Cell adhesion molecule	6,23	3,29	3,72	1,12	4,27	2,87	0	2,3	0,57	0	1,85	0,32	3,51	3,49	0	2,64	0
si:key-28118.1	TCONS_00148844	Cell adhesion molecule	12,72	12,19	12,38	36,41	0,84	9,33	0	4,83	2,28	6,95	2,73	6,95	0	0,17	0	0,26	0
zgc:174863	TCONS_00131428	Cell adhesion molecule	194,06	16,5	93,82	16,56	17,66	12,86	0,31	6,95	6,71	0,41	27,72	44,83	86,29	40,22	34,16	87,08	0
pvt13b	TCONS_00080744	Cell adhesion molecules	8,85	3,44	4,36	9,16	4,41	4,2	10,68	6,16	2,93	3,48	0,82	2,12	0,29	1,52	0,36	5,74	3,13
adgrd1	TCONS_00147428	Cell adhesion, heterodimer GPCR	7,8	8,11	4,95	19,9	9,24	0,55	1,26	2,56	1,2	0,78	5,24	1,1	0,88	1,97	0,64	1,27	0
adgrg1	TCONS_00139575	Cell adhesion, heterodimer GPCR	11,31	4,32	5,97	9,19	5,19	6,83	0,82	0,93	9	6,81	0,26	2,81	1,61	1,65	0,2	9	0
adgrg1	TCONS_00139578	Cell adhesion, heterodimer GPCR	10,53	3,86	5,97	5,86	1,29	1,03	0,04	1,85	1,32	6,37	10,88	10,9	10,33	11,69	10,87	3,34	0,07
bsg	TCONS_00083794	Cell adhesion, IC6 steele	25,06	45,33	31,69	36,52	24,97	22,13	7,17	10,66	131,31	74,43	50,35	334,42	110,25	101,33	354,42	121,16	479,57
f3a	TCONS_00095650	Cell adhesion, coagulation factor VII	544,13	15,19	61,33	10,48	5,18	3,59	5	1,83	4,31	1,37	11,93	2,53	3,88	3,94	0,29	1,32	0
f3b	TCONS_00064917	Cell adhesion, coagulation factor VII	104,03	9,27	67,02	2,87	1,34	0,41	6,04	1,79	0	0,02	0,09	22,23	0,17	2,94	0,52	3,04	1,59
f3b	TCONS_00064916	Cell adhesion, coagulation factor VII	110,9	7,58	63,54	4,15	3,3	1,3	4,3	3,79	0,82	1,06	2,03	42,95	1,38	2,82	2,29	4,34	1,56

GeneName	ID	Ligand	SE	SPG	NT	MO	WT	T	Ov	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
tfr1a	TCONS_00067717	Metabolism, transferrin	5,57	6,82	8,26	32,49	4,48	1,59	0,39	13,82	3,26	10,21	14,69	47,98	0,68	83,4	3,4	5,52	0,12
tfr1b	TCONS_00095327	Metabolism, transferrin	10,2	8	44,72	9	14,02	16,16	0,82	1,04	0,21	1,77	0,13	11,63	1,56	10,65	9	0	0,01
tfr1b	TCONS_00095328	Metabolism, transferrin	69,69	30,31	193,96	33,22	20,89	15,63	31,63	42,74	15,09	6,31	29,67	25,25	166,74	19,59	122,34	26,51	5,86
p2rx7	TCONS_00146771	Metabolism, ATP	6,51	4,54	3,46	165,19	7,4	2,69	0,14	2,62	1,82	1,16	1,37	2,21	0,51	3,59	0,39	3,26	0,14
lpar1	TCONS_00007981	Metabolism, lysophosphatidic acid	10,88	5,82	6,16	35,45	5,88	2,54	0,97	4,61	3,85	4,85	5,4	4,98	2,1	10,8	1,39	6,06	0
mchr2	TCONS_00095822	Metabolism, nonadecanecyclic peptide	5,86	3,47	3,22	10,74	4,64	0,46	0,01	1,12	0,83	0,69	0,95	0,93	0,48	1,63	0,64	0,54	0
zgc:194312	TCONS_00139131	orphan receptor, olfactory receptor	19,6	5,67	11,97	15,98	6,64	4,61	2,15	16,1	8,23	6,09	11,69	60,46	14,5	11,64	9,44	2,93	1,84
f2h1.1	TCONS_00079704	orphan receptor, tyrosin activated receptor	7,78	3,32	3,15	0,99	2,26	1,72	90,17	8,31	0,09	0,68	5,39	0,16	8	1,12	0,59	9,64	490,04
f2h1.2	TCONS_00079701	orphan receptor, tyrosin activated receptor	9,74	3,77	6,13	2,33	1,86	3,74	2,13	1	0,1	1,07	11,2	0,03	3,6	2,16	3,36	0,76	81,12

**Tableau 18 : Récepteurs membranaires préférentiellement exprimés dans les Cellules de Sertoli et spermatogonies (2/2)**

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C : coeur, I : intestin, R: Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisée

faut pas négliger la liaison possible des autres membres de la famille TGF beta (tableau 16).

#### **Groupe 4 : Récepteurs membranaires exprimés dans les spermatogonies indifférenciées isolées et dans les cellules de Sertoli (tableau 17 et 18)**

Ce quatrième groupe correspond à 63 transcrits exprimés dans les spermatogonies et dans les cellules de Sertoli. Parmi cette longue liste de transcrits, on ne distingue pas moins de 7 transcrits codant pour différents récepteurs de l'adiponectine. Cette cytokine est synthétisée par le tissu adipeux. Le récepteur Adipor a été impliqué dans le maintien du stock de SSC chez la drosophile (Laws et al., 2015).

On observe aussi la présence de deux transcrits codant pour des orthologues du récepteur au leukemia inhibitory factor (Lif). Cette cytokine régule la prolifération des gonocytes chez le poisson-zèbre (Wong et al., 2013) et permet d'augmenter la formation de colonies de cellules germinales issues de testicules néonataux de souris (Kanatsu-Shinohara et al., 2007). Le ligand proposé pour les récepteurs lifra et lifrb serait codé par le gène *m17* (membre de la famille des Il6). Le transcrit *m17* n'est pas significativement exprimé dans les cellules de Sertoli purifiées, ni dans aucun autre échantillon séquencé.

Les autres récepteurs aux cytokines se lient aux TNF, aux interférons, aux interleukines et ligands de type Cxcl. De nombreux ligands correspondants à ces familles sont exprimés par les cellules de Sertoli. Les interleukines sont impliquées dans la régulation et la différenciation cellulaires dans le testicule humain (Białas et al., 2009; Rozwadowska et al., 2007) et seraient par contre impliquées dans la différenciation sexuelle chez le poisson-zèbre (Groh et al., 2013). Les chémokines (cxcl) vont agir sur la migration et la survie des PGC et l'autorenouveaulement des SSC (Kostereva and Hofmann, 2008; McLaughlin et al., 2008). De son côté, l'interféron pourrait, d'après certaines études, améliorer la spermatogenèse et augmenter la concentration de sperme dans l'épididyme (Hibi et al., 1997).

Ce groupe contient également les récepteurs aux Igfs (Igf1ra et igf1rb). Cette observation est en accord avec la présence de récepteurs aux Igfs sur les spermatogonies et les cellules de truite décrite précédemment (Le Gac et al., 1996;

GeneName	ID	Recepteurs	Groupe	SE	SPG	NT	MO	WT	T	O	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
tnfsf10	TCONS_00095383	tnfs	P1	22,02	6,96	10,66	6,89	6,36	2,71	1,55	2,48	0,39	1,74	2,56	2,23	9	13,12	0	1,55	0
tnfa	TCONS_00059869	tnfs	P0	7,9	0,13	17,55	0,09	0,12	0,02	0	0,15	0	0	0,44	0,05	0,91	2,08	0	0,14	0
tnfsf13b	TCONS_00151294	tnfs	P0	5,49	3,79	5,27	5,99	2,81	2,12	2,26	2,2	2,5	0,92	2,72	2,72	3,32	2,7	3,15	2,06	19,52
tnfsf10	TCONS_00095382	tnfs	P0	5,46	3,51	8,42	1,51	2,87	1,32	2,07	0,56	0,17	1,09	1,26	0,47	4,09	5,12	0,81	0,96	0
tnfsf11	TCONS_00148791	tnfs	P1	4,86	2,05	3,13	1,54	1,13	0,28	0	0,59	0,21	0,05	0,77	0,27	1,1	8,93	0,32	0,2	0
tnfsf10l	TCONS_00139261	tnfs	P1	4,85	1,6	2,17	4,7	2,47	2,3	0	5,48	2,02	6,45	7,3	2,21	22,9	2,85	0,01	13,33	0
tnfsf10	TCONS_00095381	tnfs	P0	3,59	2,16	3,36	0,68	1,17	0,88	2,84	0,74	0,05	0,33	0,82	0,58	3,56	8,5	0,49	1,01	0,57
tnfb	TCONS_00036334	tnfs	P0	3,18	0,15	5,18	0,43	0,29	0,07	0	0,42	0,18	0,1	1,2	0,58	2,24	4,48	0,2	0,27	0
inhbaa	TCONS_00096504	acvr2b	P1	21,47	0,42	13,57	12,55	1,76	1,15	0,04	0,6	0,86	0,24	1,4	0,06	0,62	0,14	0	0,23	0
gsdf	TCONS_00076845	tgfb	P2	12,96	1,13	5,63	150,25	1,22	43,57	0,33	4,42	0,92	0,05	3,27	21,04	1,83	3,37	33,54	9,2	0
inhbb	TCONS_00150094	acvr2b	P3	11,62	5,33	6,04	1,71	5,44	3,41	0,06	0,57	2,24	5,01	8,54	7,81	1,26	0,34	0,8	0,56	0
tgfb3	TCONS_00052017	tgfb	P2	10,53	2,61	6,7	11,77	3,38	2,37	0,4	6,06	1,62	8,76	6,76	30,49	1,36	0,97	2,41	8,38	0,17
bmp16	TCONS_00055180	bmpr	P1	9,78	0,34	4,98	2,73	1,48	1,16	0,17	1,74	2,2	0,58	89,33	24,88	1,52	4,86	8,73	1,09	0
gdffa	TCONS_00045491	tgfb	P1	9,44	1,48	3,23	2,12	0,96	0,7	2,96	0,82	0,15	4,02	0,17	0,09	0,47	0,63	0	0,6	0,21
gsdf	TCONS_00076846	tgfb	P2	7,44	0,46	3,32	405,29	52,45	35,05	0	2,78	1,53	0	0,01	2,92	0,01	0,31	0,03	0,01	0
tgfb2	TCONS_00043091	tgfb	P1	6,33	1,57	3,23	5,36	2,21	0,85	0,28	3,25	2,5	1,52	1,42	47,6	1,54	0,93	0,69	8,05	0,1
tgfb1a	TCONS_00037275	tgfb	P1	4,36	0,34	4,25	1,97	0,86	0,17	0	1,08	0,55	0,38	1,17	2,41	0,72	0,91	1,19	1,13	0
tgfb2l	TCONS_00031888	tgfb	P2	4,32	1,21	1,62	11,17	2,01	0,69	0,05	2,87	1,71	0,25	5,35	1,16	0,76	0,74	0,26	4,81	0,03
bmp6	TCONS_00094455	bmpr	P2	3,09	0,32	0,96	5,61	0,36	0,26	0,18	0,27	0,05	0,63	1,29	0,48	0,23	0,57	0,39	0,12	0
ifnph1	TCONS_00109123	crfb	P0	3,64	3,52	3,52	0,77	0	0,43	0	0,27	0,21	5	1,15	0	0,82	1,52	0	0,31	0,28
ifnph1	TCONS_00109122	crfb	P3	4,81	1,23	1,53	0	1,04	0,09	0	0,61	0	0,05	0,95	0,5	0,96	0,24	0,82	0,32	0
cxcl18b	TCONS_00006323	CXCR	P1	5733,05	34,55	1922,79	11,49	9,82	1,88	0,11	15,24	1,08	0,37	18,55	11,39	9,28	57,15	10,46	16,43	0
cxcl19a.1	TCONS_00119498	CXCR	P0	572,61	13,02	421,23	1,81	25,53	13,84	0,05	11,59	3,66	0,16	2,61	0,59	13,42	14,42	6,65	10,71	0,88
cxcl20	TCONS_00125483	CXCR	P1	15,72	0,74	13,78	8,94	1,61	0,62	0	2,22	0,1	0,25	1,06	5,14	6,17	47,78	75,02	1,16	0
cxcl32b.1	TCONS_00095457	CXCR	P3	9,53	0,47	9,29	1,15	1,52	0,4	0	1,5	0,59	0,02	3,21	1,1	4,29	4,9	0,86	0,64	0
cxcl25b	TCONS_00015286	CXCR	P2	6,86	0,44	4,37	39,49	8,74	6,18	0,19	16,97	13,07	0,41	150,27	8,88	24,19	784,51	33,35	17,29	0
cxcl20b	TCONS_00095324	CXCR	P0	5,88	1,05	2,78	0	0,59	1,99	0	1,1	0	0,03	42,45	5,02	9,03	1,48	0,45	0,82	0
cxcl34b.4	TCONS_00098142	CXCR	P1	5,26	0,43	5,49	1,12	1,05	0,4	0,19	4,08	0,86	0,16	5,71	10,55	2,78	15,41	0,91	2,68	0
cxcl19a.2	TCONS_00119489	CXCR	P3	4,68	0,34	3,19	0,31	3,38	2,96	0	0,18	0,09	0	14,41	0,04	0,93	0,07	0,25	0	1,48
cxcl34b.4	TCONS_00098141	CXCR	P0	4,6	0,6	6,35	4,21	7,19	4,17	0	31,45	4,75	5	32,32	75,41	15,94	155,55	12,08	22,45	0
cxcl20b	TCONS_00095326	CXCR	P0	4,27	1,65	2,38	0	0	0,14	0	0,71	0	0	6,13	0,49	1,03	1,74	0	0	0
cxcl12b	TCONS_00087565	CXCR	P0	3,26	0,87	3,16	32,3	2,68	1,82	0,05	27,91	15,33	33,53	8,39	16,34	2,38	45,10	0,22	59,82	0

**Tableau 19 : Ligand de la famille des cytokines préférentiellement exprimés dans les cellules de Sertoli.**

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C : coeur, I : intestin, R : Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisée

Loir and Le Gac, 1994). D'autre part, les Igfs ont la capacité de stimuler la prolifération des spermatogonies indifférenciées chez la truite (Loir and Le Gac, 1994), l'anguille (Nader et al., 1999) et le poisson-zèbre (Leal et al., 2009b). Le ligand Igf2b est exprimé par les cellules de Sertoli.

Enfin, on peut noter que ce groupe contient 15 transcrits codant pour des molécules impliquées dans la reconnaissance cellulaire et l'adhérence cellulaire. On retrouve des représentants de la grande famille des protéines d'adhésion liées à un récepteur couplé aux protéines G (*adgr*), une immunoglobuline (*cd276*), des facteurs de coagulation (*f3a* et *f3b*), la basigin (*bsg*) dont le KO entraîne la stérilité chez les souris (Bi et al., 2013), une protéine ayant une activité GTPase (*iqgap2*) et enfin *pvr13* qui peut aussi être identifié comme *nectin3*. Les molécules d'adhésion de type Nectin ou Nectin-like, ont récemment été mises en évidence comme régulatrices de la spermatogenèse (Huang and Lui, 2016).

### **3.3. Analyse des ligands sertolien**

L'analyse des données de RNAseq met en avant un certain nombre de ligands fortement exprimés dans les cellules de Sertoli présentant des liens avec les récepteurs présents à la surface des spermatogonies. Ces ligands peuvent être classés en 3 groupes en fonction des familles auxquelles elles font partie (tableau 19 à 21).

#### **Groupe 1 : Ligand de la famille des cytokines (tableau 19)**

Ce premier groupe fait ressortir en tout 20 ligands d'intérêts. On retrouve 8 membres des facteurs de nécrose tumorale (TNF) qui sont principalement connues pour leur implication dans les mécanismes d'inflammation et de réaction immunitaire (Sonar and Lal, 2015). Il y a aussi 7 membres de la famille des TGF $\beta$  qui est une très grande famille de cytokines dont de nombreux membres sont impliqués dans des processus du développement testiculaire (pour revue :Young et al., 2015). Nous retrouvons aussi 2 membres des interférons et 11 chémokines. Ces chémokines de la famille des cxcl et ccl ont bien été mises en avant comme importantes dans certains processus comme la migration et la survie des PGC (McLaughlin et al., 2008) ou le maintien des SSC chez la souris (Chen et al., 2005). On sait par exemple



GeneName	ID	Recepteurs	Groupe	SE	SPG	NT	MO	WT	T	O	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
pvr12l	TCONS_00061521	Pvr11a, Cadm1a	P1	23,77	0,83	7,58	9,07	2,25	1,83	3,01	5,74	34,49	2,49	4,7	1,6	2,87	2,41	0,42	2,46	3
pvr12l	TCONS_00061543	Pvr11a, Cadm1a	P1	19,83	1,11	6,2	5,86	1,12	3	3	3	3	3	0,11	3	3,11	1,25	4,8	3	3
epb4115	TCONS_00152657	Pvr11a, Cadm1a	P1	16,04	3	8,29	7,4	1,86	1,02	0,56	0,18	0,17	0,31	0,61	0,39	0,32	0,91	3	0,18	1,25
cadm4	TCONS_00044517	Pvr11a, Cadm1a	P1	12,57	0,57	5,38	1,4	1,07	1,94	0,04	1,31	0,42	0,2	1,95	0,41	1,94	3,19	1,44	0,53	0,34
pvr13b	TCONS_00080744	Pvr11a, Cadm1a	P2	8,85	3,44	4,36	9,16	4,41	0,85	2,58	9,76	5,45	8,14	8,02	14,83	35,93	4,59	8,82	10,16	18,43
epb4115	TCONS_00152653	Pvr11a, Cadm1a	P2	6,86	0,89	4,13	14,07	3,21	1,78	0,16	1,59	11,42	2,48	9,33	1,15	1,04	1,5	1,82	0,41	0,22
CRTAM	TCONS_00008943	Pvr11a, Cadm1a	P1	4,67	0,34	3,82	3,54	3,46	0,2	3	0,88	0,11	3	2,74	0,78	5,08	5,66	0,28	0,63	3
epb4113b	TCONS_00070418	Pvr11a, Cadm1a	P0	4,58	2,89	9,52	5,45	8,45	4,2	18,68	3,16	2,93	3,48	0,82	2,12	0,29	1,52	0,36	5,74	3,13
pvr13b	TCONS_00080754	Pvr11a, Cadm1a	P2	4,55	0,93	1,13	6,25	3,01	1,29	0,2	0,16	0,09	1,62	7,27	0,82	3	0,62	3	0,45	3
pvr13b	TCONS_00080734	Pvr11a, Cadm1a	P3	3,19	0,5	1,06	0,56	0,82	0,2	1,36	0,25	3	3	0,03	0,06	0,02	3	3	0,46	0,75

**Tableau 20 : Molécules d'adhésion cellulaire préférentiellement exprimés dans les cellules de Sertoli.**

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C: coeur, I : intestin, R: Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Oeuf non fertilisée

que l'inhibition de la voie Cxcr4/Cxcl12 entraîne une perturbation de l'autorenouveau des SSC (Yang et al., 2013).

### **Groupe 2 : Les molécules d'adhésion cellulaire (tableau 20)**

Nous avons montré précédemment qu'un certain nombre de molécules d'adhésion étaient présentes au niveau des spermatogonies au sein du testicule. On retrouve d'autres membres de cette grande famille qui semblent spécifiquement exprimés au niveau des cellules de Sertoli. On sait que les interactions entre protéines d'adhésion, au niveau extracellulaire, sont cruciales pour le développement des organismes et permet l'expression de signaux de signalisation au sein de ces cellules (Charoensawan et al., 2010). Cependant, nous n'avons encore que peu d'informations sur le rôle exercé par ces différentes molécules dans le cadre de la spermatogenèse.

### **Groupe 3 : Les facteurs de croissance (tableau 21)**

On connaît le rôle important des facteurs de croissance dans la survie et le développement cellulaires. Nos données de transcriptomique mettent bien en avant une expression d'un certain nombre de facteurs de croissance connus et dont les récepteurs ont été identifiés au niveau des spermatogonies. C'est le cas des Igf et des Fgf. De manière intéressante, nous avons aussi identifié des ligands plus inattendus (prosaposine, endotheline 2) qui présentent des récepteurs qui pourraient être restreints aux spermatogonies indifférenciées. Enfin, pour un grand nombre de facteurs de croissance, nos données ne nous permettent pas d'identifier de récepteur au sein du testicule. On notera aussi l'absence notable des ligands Lif, Gdnf et Wnt. En effet, les récepteurs du Lif et de Wnt sont bien présents dans les spermatogonies, mais nous n'avons pas relevé d'expression significative de leurs ligands potentiels dans les cellules de Sertoli purifiées, ni dans le testicule des animaux sexuellement matures. On pourrait émettre l'hypothèse que ces molécules agissent bien sur les cellules spermatogoniales, mais qu'elles seraient sécrétées plus tôt au cours du développement testiculaire et/ou par d'autres types cellulaires absents du testicule ou présents en faible proportion. Certaines molécules pourraient être apportées par la voie sanguine. C'est le cas de l'adiponectine, qui présente un récepteur au niveau des spermatogonies, mais qui est synthétisée par les adipocytes

GeneName	ID	Recepteurs	Groupe	SE	SPG	NT	MO	WT	T	O	Ar	Cerv	E	B	C	I	R	F	M	UE
psap	TCONS_00022917		P1	63.44	2.6	51.23	45.4	13.94	7.92	2.69	34.74	60.66	31.68	27.46	63.06	11.63	62.8	38.95	58.28	80.71
hbegfa	TCONS_00028514		P3	81.1	6.49	21.47	1.59	4	2.85	18.31	12.21	0.74	2.61	14.83	14.38	11.52	6.89	5.87	20.73	32.1
vegfr	TCONS_00005773		P1	50.71	1.3	11.79	2.64	0.95	0.61	0.13	0.66	0.96	0.63	2.35	0.31	0.8	5.65	0.27	0.76	0
efna1b	TCONS_00041192		P1	24.07	6.26	12.61	5.44	5.38	4.07	0.4	9.09	5.72	13.05	18.55	7.45	16.44	4.66	3.62	12.49	0.48
efnb2a	TCONS_00149347		P3	21.9	4.07	9.63	4.92	5.67	6.12	0.01	2.49	6.71	15.14	7.8	1.93	0.66	2.88	1.38	2.46	0.07
efnb1	TCONS_00125040		P1	15.99	4.27	6.19	14.53	3.7	2.44	0.01	4.46	6.49	9.87	6.66	4.3	5.18	7.99	1.58	10.52	0
vegfaa	TCONS_00043217		P1	15.84	2.91	10.19	15.08	2.3	0.98	0.08	5.23	1.78	1.43	3.39	9.06	3.16	5.94	0.39	6.28	0
edn2	TCONS_00062201		P1	13.49	0	0.61	0.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gsdf	TCONS_00076845		P2	12.96	1.13	5.93	150.25	1.22	43.97	0.33	4.42	0.92	0.05	3.27	21.04	1.63	3.37	38.85	9.2	0
efna1a	TCONS_00058805		P2	10.5	2.39	5.84	14.43	4.01	3.51	0.05	3.53	23.55	10.11	5.93	9.23	11.03	6.23	5.8	5.67	0
vegfab	TCONS_00115604		P2	10.53	0.72	3.54	21.65	2.23	1.25	0.03	7.15	4.74	1.26	0.81	25.05	8.03	25.52	46.4	10.9	0
vegfab	TCONS_00115591		P3	9.31	0.78	2.54	0.19	2.52	0.49	0	0	0	0	0	0.06	0.05	0	0	0.15	0
bdnrf	TCONS_00139819		P3	7.55	1.8	2.32	0	0.43	0.28	0.05	0.87	17.58	0.47	0.48	0.1	0.07	0	0	0.03	0.17
gsdf	TCONS_00076846		P2	7.44	0.46	3.32	405.25	52.45	35.05	0	2.76	1.53	0	0.01	2.82	0.01	0.31	0.03	0.01	0
vegfc	TCONS_00005772		P1	7.43	0.16	2.21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0.2	0	0
efnb3b	TCONS_00134772		P0	6.72	4.23	3.98	11.77	2.41	1.84	0.09	1.08	7.93	12.25	8.45	9.72	0.14	0.1	0.49	0.62	0.03
macf1a	TCONS_00063454		P1	6.3	0.23	2.02	4.28	0.88	0.91	0.21	3.27	5.54	3.43	5.57	15.94	2.27	2.1	1.72	3.72	0
vegfab	TCONS_00115606		P2	6.09	0.71	1.44	15.85	2.37	0.44	0	2.23	0.91	0.74	0.56	8.3	1.88	4.76	0.93	3.72	0
efnb3a	TCONS_00008577		P1	5.94	2.78	4.42	1.85	1.79	0.67	0.04	0.56	0.86	4.68	0.66	8.9	0.28	1.28	1.87	0.79	0.12
vegfab	TCONS_00115605		P0	5.23	1.23	3.07	0	1.14	1.31	0.02	0.76	0.41	0.5	0.71	1.17	1.27	1.61	0.46	1.3	0
PDGFC	TCONS_00033649		P1	4.82	0.39	1.47	2.9	0.77	0.43	0.25	1	1.19	1.78	0.55	1.23	0.54	0.3	0.72	1.80	3.74
PDGFB	TCONS_00087742		P1	4.63	0.82	2.11	3.28	0.53	0.47	0.04	4.19	3	1.05	1.77	2.87	1.23	3.07	0.88	6.88	0
amhr	TCONS_00087062		P3	4.26	0.23	0.95	2.8	19.26	18.06	0	0.03	0.05	0.08	0.04	0.03	0	0.04	0	0	0
fgfr1a	TCONS_00032767		P0	4.21	2.89	2.02	9.89	2.64	1.46	0.02	1.29	8.91	2.08	1.06	1.2	0.36	0.31	0	0.18	0.12
igf2b	TCONS_00103290		P2	4.04	0.77	1.14	12.44	0.89	0.34	0	3.76	2.46	1.96	4.93	3.08	5.65	36.97	12.54	3.01	0
vegfaa	TCONS_00043216		P0	3.92	2.79	4.08	2.03	0.52	0.19	0.54	2.06	1.86	1.91	0.75	4.66	1.13	0.62	0	2.94	4.03

**Tableau 21 : Facteurs de croissance préférentiellement exprimés dans les cellules de Sertoli.**

SE : Sertoli, SPG : Spermatogonies indifférenciées, NT : Non-Trié, MO : Morpholino WT : wild-type, T : Testicules, O : ovaire, Ar : Arêtes, Cerv : Cerveau, E : Embryon, B : Branchies, C: coeur, I : intestin, R: Reins, F : Foie, M : Muscle, UE : Œuf non fertilisée.

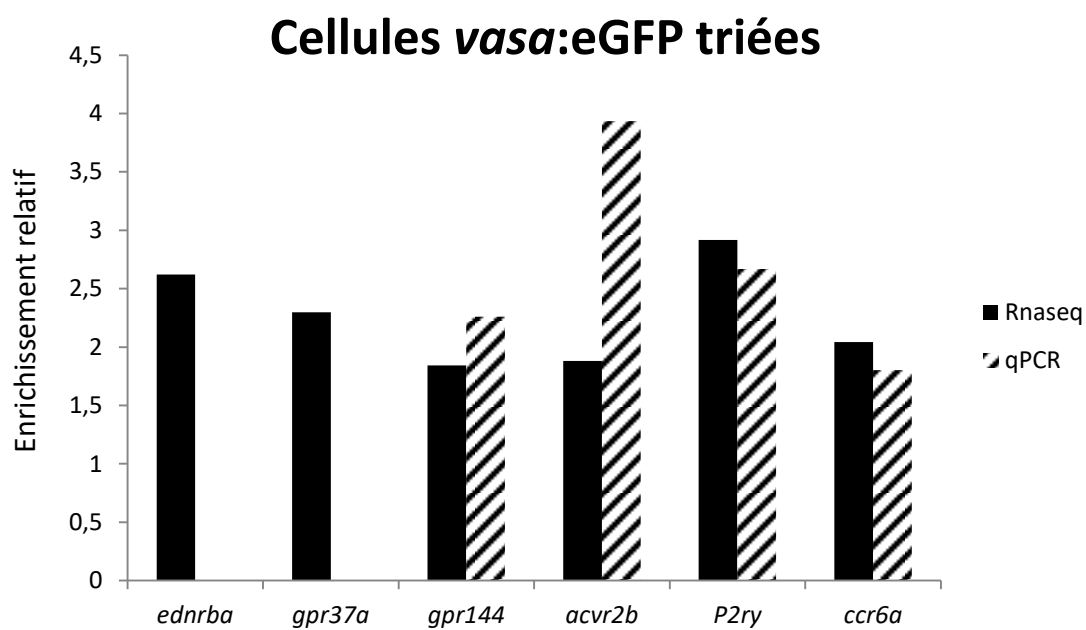
et relarguée dans le sang. Il en est de même, pour les acides biliaires synthétisés au niveau du foie.

En résumé, l'ensemble des données nous permet de mettre en avant un certain nombre de couples d'interactants ligand /récepteur précédemment identifiés ou proposés chez les mammifères, les insectes et/ou les poissons (IGF, FGF, TGF $\beta$ , chemokine...), mais aussi d'identifier de nouveaux couples dont le rôle potentiel sur le devenir des SSC reste à être précisé (Endothéline 2, prosaposine, ATP extracellulaire, TNF...).

### **3.4. Identification de couple ligand/récepteur d'intérêt.**

Parmi les nouvelles voies de régulations, nous avons sélectionné 5 couples ligand/récepteur d'intérêts, P2ry/ATP ; Ednra/Edn2 ; Ccr6/Ccl20, Gpr37/Psap, Acvr2b-2/Tgf $\beta$  et aussi un récepteur orphelin Gpr144 (Adgrd2). Ces six voies d'intérêts présentaient des caractéristiques intéressantes, comme une expression de récepteurs restreinte aux cellules spermatogoniales indifférenciées et un ligand spécifique des cellules de Sertoli. On notera juste l'exception de Gpr144, qui en tant que récepteur orphelin ne possède pas de ligand identifié à ce jour, mais qui au vu de son profil d'expression restreint à la gonade et aux cellules spermatogoniales indifférenciées, est un candidat très intéressant. Pour ces 6 voies d'intérêts, nous avons essayé de confirmer l'enrichissement des récepteurs dans nos fractions de spermatogonies indifférenciées par une analyse qPCR (Figure 52). Cette analyse n'a pu être réalisée que sur 4 des 6 récepteurs, les amorces pour *ednra* et *gpr37* n'ayant pas été validées de par une trop faible expression de ces gènes dans le testicule total. Cependant, on note que pour les 4 récepteurs testés, nous retrouvons bien un fort enrichissement dans les fractions de spermatogonies indifférenciées en accord avec les données de transcriptomique. On a un enrichissement de 2 pour *gpr144* et *ccr6a*, 3 pour *p2ry* et 4 pour *acvr2b*.

Ces 6 voies de régulations seront ensuite analysées précisément chez une autre espèce de poisson téléostéen, la truite-arc-en ciel. Les résultats seront traités dans le chapitre 3 des résultats.



**Figure 52 : Enrichissement des récepteurs d'intérêt observé en qPCR et Rnaseq.**

L'enrichissement est calculé en faisant le rapport d'expression entre cellules fluorescentes purifiées et cellules non triée. Il n'y a pas de différence significative entre les données Rnaseq et qPCR d'après un test de Student avec intervalle de confiance de 95%

# RESULTATS

---

**Partie 3: Conservation des voies de régulation paracrine  
potentiellement impliquées dans la régulation du stock de  
SSC chez les vertébrés.**

Comme exposé précédemment, l'analyse des données de transcriptomique a permis de faire ressortir, entre autres, 6 couples ligands/récepteurs membranaires correspondants à nos critères de sélection. Afin d'explorer l'intérêt générique de ces voies de régulation candidates, nous avons cherché à déterminer si les gènes qui en sont à l'origine étaient bien retrouvés chez d'autres espèces de Vertébrés en incluant de nombreuses espèces d'intérêt agronomique du groupe des poissons téléostéens (truite, saumon) ou du groupe des oiseaux (poulet). La même démarche a été appliquée à toutes les voies de régulation candidates mais seuls les exemples des couples Ednrba/End2 et P2ry1-like/ADP seront détaillés dans ce document.

Pour chaque gène d'intérêt, nous avons recueilli, via les bases de données Ensembl (v85) et du NCBI, les séquences protéiques paralogues chez le poisson-zèbre et les gènes homologues chez d'autres espèces représentant des taxons bien distincts et répartis sur l'ensemble des ramifications de l'arbre de la vie (mammifères, oiseaux, poissons à nageoires pédonculées, poissons osseux téléostéens, poissons osseux non téléostéens, poissons cartilagineux, poissons sans mâchoires...). Lorsque cela était possible, nous avons essayé de considérer au moins 3 espèces par groupe taxonomique (mammifères, oiseaux, poissons téléostéens) pour prendre en compte les différents événements de duplication globale des génomes (2R, 3R, et 4R) et le fait que tous les génomes ne sont peut-être pas encore entièrement séquencés. Pour certaines espèces encore peu annotées, mais d'intérêt, comme la truite ou le saumon, nous avons dû effectuer une recherche manuelle systématique sur les différentes bases de données publiques de génome ou d'ESTs interrogeables (NCBI, Sigenae, phylofish, Genoscope). Cette recherche manuelle a dû être également entreprise dans le cas de génomes considérés comme bien annotés lorsque l'absence de gène(s) orthologue(s) étai(en)t observée.

Les séquences protéiques correspondantes aux différents gènes candidats ont été recueillies pour construire une nouvelle base de données locale, puis alignées à l'aide du module ClustalW pour construire un arbre phylogénétique à l'aide du logiciel Mega (Version7). Cet arbre, permet de visualiser plus aisément non seulement les relations de paralogie et d'orthologie entre les gènes homologues, mais aussi de mieux comprendre l'histoire évolutive des gènes d'intérêt, voire des interactions entre les récepteurs et leurs ligands.

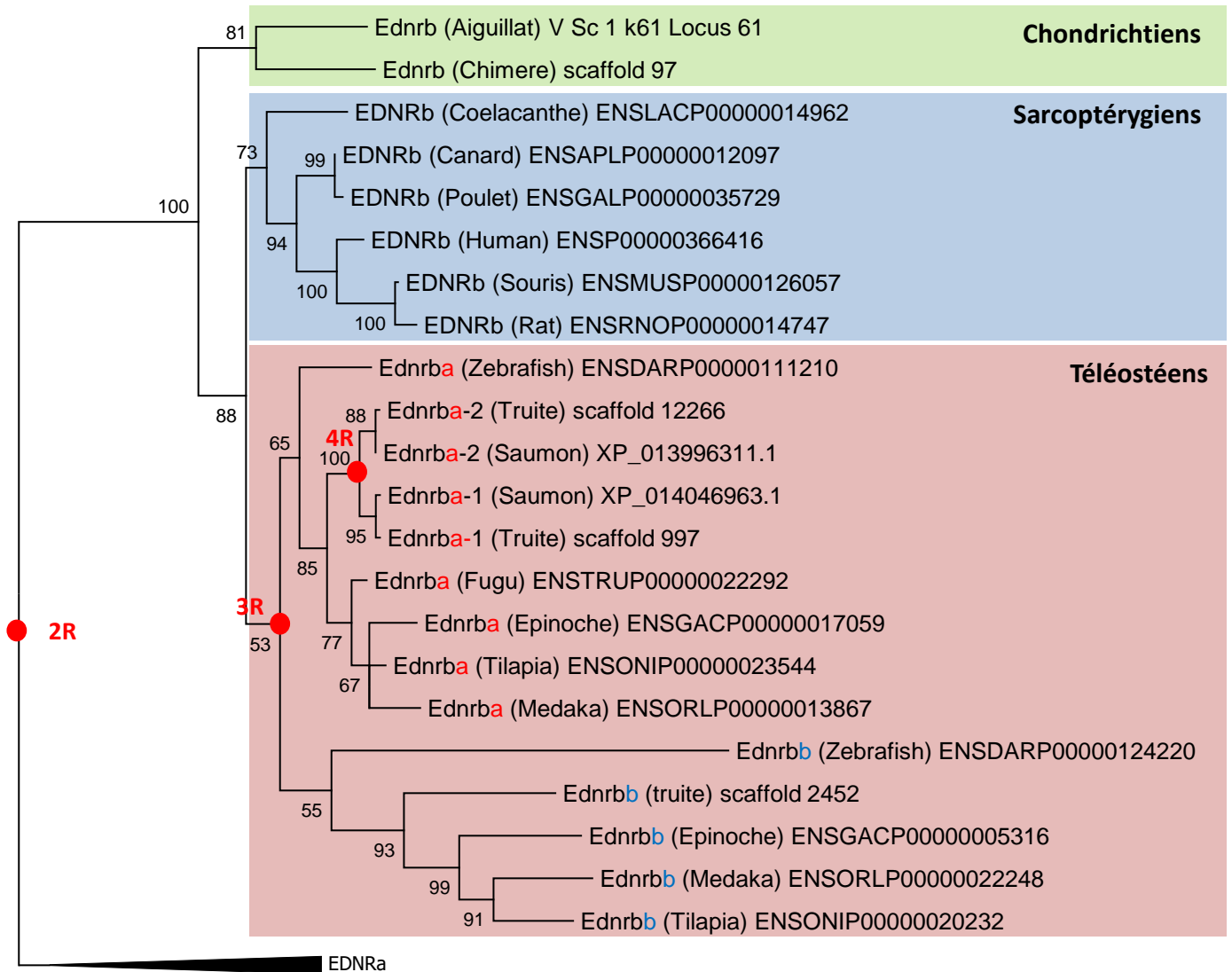
# **1. Conservation des gènes impliqués dans les voies de régulation candidates chez les vertébrés**

## **1.1. Voie de régulation paracrine potentielle *Ednrba/Edn2***

Les analyses transcriptomiques ont révélé qu'un seul type de récepteur à l'endothéline (*Ednrba*) était préférentiellement exprimé dans les spermatogonies fluorescentes purifiées. L'arbre phylogénétique, construit à partir des séquences protéiques des différents membres de la famille des récepteurs à l'endothéline, montre que les séquences recueillies chez les vertébrés ségrègent en deux groupes nommés *ednra* et *ednrb* (figure 53). Il est possible qu'un gène ancestral des prochordés ou des lamproies, ait été dupliqué pour donner ces deux groupes de gènes. Nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'évolution du gène *ednrb*, qui est présent chez les poissons chondrichthyens comme l'aiguillat ou le masca laboureur. Le gène *ednrb* est conservé, en copie unique, chez tous les sarcoptérygiens, incluant le coelacanthe, les mammifères et les oiseaux. Par contre, chez la plupart des poissons téléostéens, on constate qu'il existe deux gènes homologues nommés *ednrba* et *ednrbb*. Ces deux gènes sont probablement issus de la duplication totale du génome de l'ancêtre des poissons téléostéens (duplication nommée 3R). L'analyse des différentes données récupérées permet aussi de mettre en avant un nombre de gènes homologues plus important pour les poissons de la famille des Salmonidés (truite arc-en-ciel et saumon atlantique). Il existe en effet deux copies du gène *ednrba* chez la truite et le saumon nommées *ednrba-1* et *ednrba-2* (figure 53). Ces deux copies du gène *ednrba* sont toutes les deux aussi proches l'une que l'autre de la forme du poisson-zèbre. Il est probable que les deux gènes homologues *ednrba-1* et *ednrba-2* représentent en fait des gènes ohnologues qui sont issus de la duplication récente et totale du génome de la truite et du saumon (4R). Étant donné que chaque copie des homologues de truite ségrège avec l'un des gènes ohnologues de saumon, il est probable que cette duplication ait eu lieu chez une espèce ancestrale des salmoninae.

L'analyse des ligands spécifiques aux récepteurs de l'endothéline montre un profil d'évolution aussi complexe. Les arbres phylogénétiques générés, montrent que les gènes homologues de l'endothéline ségrègent au moins en trois groupes nommés endothéline 1 (*edn1*), endothéline 2 (*edn2*), et endothéline 3 (*edn3*). Les





0.050

**Figure 53 : Arbre phylogénétique retraçant l'histoire évolutive du récepteur à l'endothéline de type B (EdnrB) chez les vertébrés.**

Le nom commun des espèces est indiqué entre parenthèses et il est suivi du numéro d'accèsion des protéines aux différentes bases de données Ensembl, NCBI ou de Sigenae.

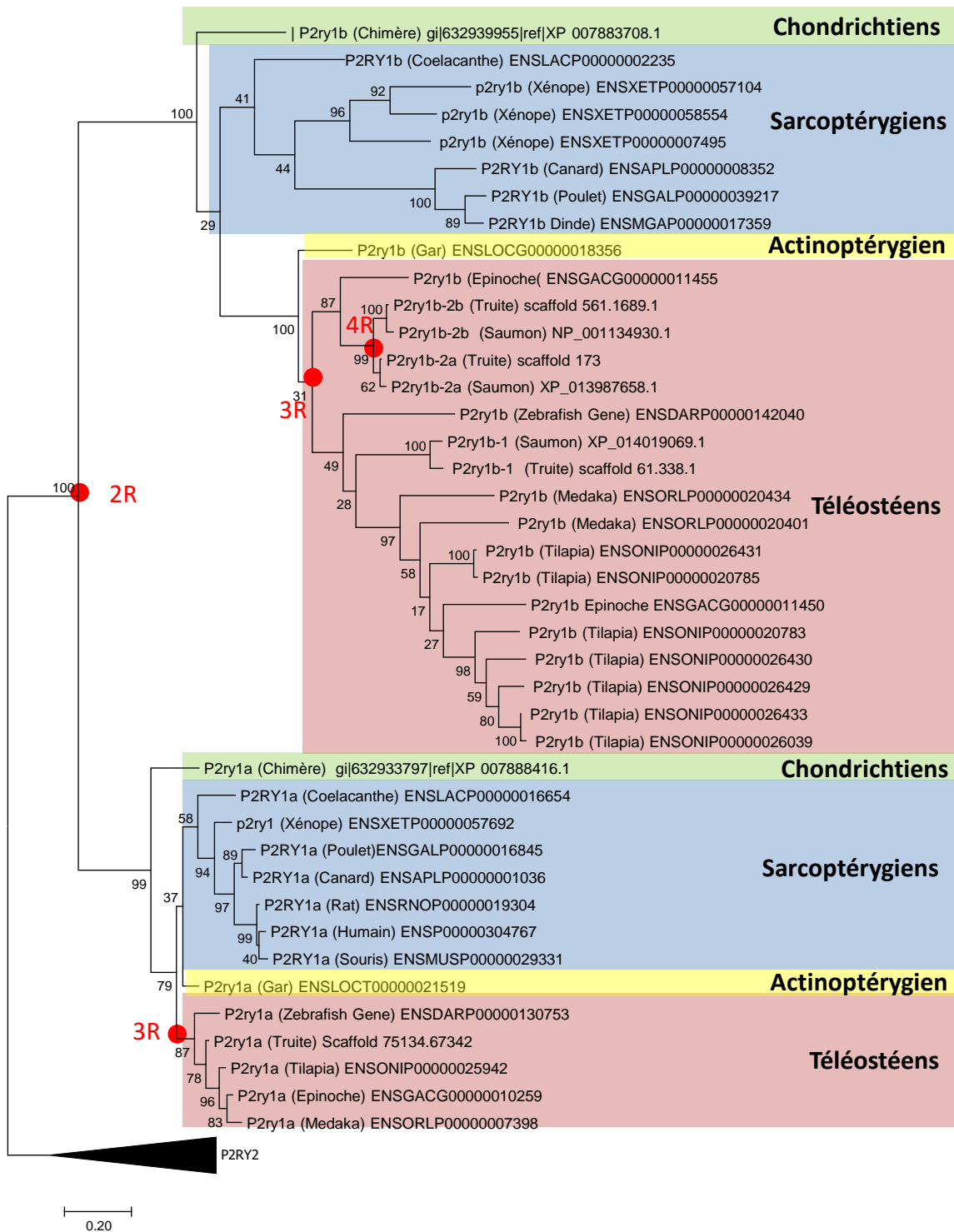
2R, 3R et 4R : évènements de duplication globale des génomes.

gènes de type *edn1*, *edn2*, et *edn3* sont en copie unique chez les chondrichthyens et les sarcoptérygiens incluant les mammifères et les oiseaux. Par contre, les gènes *edn2* et *edn3* sont dupliqués chez les poissons téléostéens probablement suite à la duplication 3R. La transcrite *edn2* détecté chez le poisson-zèbre correspond au gène *edn2a*. Il existe une duplication supplémentaire du gène *edn2a* chez la truite et le saumon qui pourrait résulter de la duplication 4R intervenue chez l'ancêtre commun aux salmoninae (non illustrée).

En résumé, les analyses phylogénétiques suggèrent que les gènes du couple récepteur (*ednrba*) / ligand (*edn2*) identifiés chez le poisson-zèbre sont bien conservés chez les vertébrés mais il existe une duplication supplémentaire chez les salmoninae.

### **1.2. Voie de régulation paracrine potentielle P2RY1b/ADP extracellulaire**

L'analyse phylogénétique du gène codant pour le récepteur P2ry1b a été entreprise pour préciser son annotation fonctionnelle, déterminer son origine, et étudier sa conservation potentielle au cours de l'évolution. Initialement, le transcrite détecté par le séquençage RNAseq était référencé sous le nom « si:dkey-78k11.9 ». L'analyse des gènes homologues retrouvés chez les vertébrés a rapidement indiqué que ce transcrite codait pour un nouveau membre de la superfamille des récepteurs adrénergiques P2ry. L'arbre phylogénétique, construit avec de nombreux représentants des 10 familles de P2ry, nous a permis de confirmer que la protéine déduite du transcrite ségrège avec les membres de la famille des P2ry1 (non illustré). Seul un extrait de cet arbre, enraciné avec les séquences des gènes P2ry2, est présenté sur la figure 54. On peut constater que la protéine codée par le transcrite si:dkey-78k11.9 chez le poisson-zèbre, ne ségrège pas avec les récepteurs annotés P2ry1a préalablement identifiés chez les mammifères, les oiseaux et les poissons téléostéens dont le poisson-zèbre. Par contre, la nouvelle protéine de poisson-zèbre ségrège avec un autre groupe de protéine que nous avons annoté P2ry1b. Il est intéressant de noter que ce groupe ne contient aucune espèce de mammifères. Nos efforts pour rechercher un gène orthologue potentiel chez d'autres mammifères placentaires ou non placentaires (marsupiaux et monotrèmes) sont restés vains. L'analyse de l'arbre phylogénétique montre que les gènes *p2ry1a* et *p2ry1b* sont apparus avant l'émergence des poissons chondrichthyens, probablement lors de la



**Figure 54 : Arbre phylogénétique retraçant l'histoire évolutive du récepteur purynergique (P2ry) chez les vertébrés.**

Le nom commun des espèces est indiqué entre parenthèses et il est suivi du numéro d'accèsion des protéines aux différentes bases de données Ensembl, NCBI ou de Sigenae.

2R, 3R et 4R : : évènements de duplication globale des génomes.

duplication 2R du génome des vertébrés. De manière assez remarquable, on peut constater que la duplication 3R est probablement responsable de l'émergence des copies *p2ry1b-1* et *p2ry1b-2* chez les salmonidés. Dans ce taxon, la duplication supplémentaire 4R pourrait expliquer la présence de deux copies ohnologues supplémentaires du gène *p2ry1b-2* que l'on a nommé *p2ry1b-2a* et *p2ry1b-2b*. Chez le tilapia, le gène *p2ry1b* est présent sous la forme de multiples copies placées en tandem sur le génome. Chez cette espèce, il est probable que l'augmentation du nombre de copies du gène *p2ry1b* a été engendrée par un mécanisme de duplication locale *in situ*. En conclusion, la voie de régulation P2ry1b/ADP extracellulaire est bien conservée chez les poissons téléostéens, même si des événements de duplication spécifiques à certaines espèces ou taxons sont observés. Cette conservation s'étend aux oiseaux, mais le gène *p2ry1b* a été perdu chez l'ancêtre des mammifères.

### **1.3. Voie de régulation paracrine potentielle Ccr6/Ccl20 et Gpr37/Psap**

L'histoire évolutive de ces deux gènes semble assez proche de ce qui a été observé chez les récepteurs à l'endothéline. En effet, les gènes codants pour les récepteurs Ccr6 et Gpr37 sont retrouvés en une seule copie chez les Sarcoptérygiens et les Actinoptérygiens non téléostéens. Par contre, la duplication 3R, subit par l'ancêtre des poissons téléostéens, a entraîné l'apparition de deux gènes homologues pour chaque gène, nommé *ccr6a*, *ccr6b* et *gpr37a*, *gpr37b*. Ce nombre de gènes augmente encore chez les poissons de la famille des Salmonidés. La duplication 4R est probablement à l'origine de l'apparition de deux copies de chaque gène (*ccr6a1*, *a2*, *b1*, *b2*) et (*gpr37 a1*, *a2*, *b1*, *b2*).

Concernant le ligand de Ccr6, la cytokine Ccl20, on retrouve une forme du gène chez les Sarcoptérygiens et les Actinoptérygiens non téléostéens. Comme précédemment, la duplication 3R est probablement à l'origine de l'apparition des copies Ccl20a et Ccl20b. De manière intéressante, la forme Ccl20a semble être progressivement perdue, puisqu'on ne le retrouve que chez le poisson-zèbre et pas chez les autres poissons téléostéens. La forme Ccl20b perdure elle chez tous les téléostéens et est dupliquée chez les salmonidés suite à la duplication 4R.

Pour le ligand Psap, l'arbre généré est assez simple, en effet, on retrouve une seule forme de Psap dans les différents taxons des Gnastostomes. Les différentes duplications 3R du génome n'ont pas entraîné de nouvelle forme de ce gène, excepté encore une fois chez les salmonidés où la duplication 4R a probablement généré 2 formes pour la Psap.

#### **1.4. Voie de régulation paracrine potentielle Acvr2b-2/membres des TGF beta**

L'arbre phylogénétique, construit à partir des séquences protéiques des différents membres de la famille des récepteurs à l'activine de type 2, montre que les séquences recueillies ségrègent en deux groupes nommés Acvr2a et Acvr2b. Il est possible, qu'un gène ancestral aux Gnastostomes ait été dupliqué pour donner ces deux groupes de gènes. Il n'existe qu'une seule copie du gène codant pour un récepteur de type Acvr2b chez tous les sarcoptérygiens. En revanche, deux copies du gène, nommées *acvr2b.1* et *acvr2b.2*, sont retrouvées chez les poissons téléostéens. Ces deux copies sont elles-mêmes dupliquées chez la truite et le saumon probablement suite à la duplication 4R.

Chez les mammifères, les récepteurs *acvr2b* se lient préférentiellement aux activines A, B ou AB qui sont constituées de deux sous-unités de type inhibine  $\beta_a$  et/ou  $\beta_b$ . L'analyse transcriptomique révèle que deux transcrits codant pour des sous-unités de type  $\beta_a$  (*inhba*) et  $\beta_b$  (*inhbb*) de l'inhibine sont exprimés très préférentiellement dans les cellules de Sertoli. Cependant, ce type de récepteur *Acvr2b* est connu pour être capable de lier un grand nombre de membres de la famille des TGF- $\beta$  avec des affinités différentes (de Caestecker, 2004).

#### **1.5. Voie de régulation paracrine par les récepteurs orphelins GPR144**

L'histoire évolutive de ce récepteur semble assez proche de ce que l'on a observé avec P2RY1b. En effet, on peut constater que la protéine codée par le transcrit « si:ch211-200o1.1 » chez le poisson-zèbre, ne ségrège pas avec les récepteurs annotés *Adgrd2a* préalablement identifiés chez les Sarcoptérygiens et les poissons téléostéens. Par contre, la nouvelle protéine de poisson-zèbre ségrège

Chondrichthyen	Chimère	<u>Ednr<b>b</b></u> scaffold 97	<u>Gpr37</u> gi 632961617  ref XP 007896854.1	<u>Ccr6</u> scaffold 34	<u>Acvr2b</u> scaffold_839	<u>P2ry1b</u> gi 632939955 re f XP 007883708.1	<u>Adgrd2b</u> scaffold 7
Actinoptérygien	Gar	<u>Ednr<b>b</b></u> ENSLOCP000000 06525	<u>Gpr37</u> enslocp000000 19521	<u>Ccr6</u> enslocp000000219 80	<u>Acvr2b</u> Enslocp00000012 160	<u>P2ry1b</u> ENSLOCG000000 18356	<u>Adgrd2a</u> ENSLOCP000000 06232
Téléostéens	Truite	<u>Ednrba-1</u> scaffold 997  <u>Ednrba-2</u> scaffold 12266	<u>Gpr37a-1</u> scaffold 122,8371,1  <u>Gpr37a-2</u> scaffold 8496	<u>Ccr6a-1</u> scaffold 1581  <u>Ccr6a-2</u> scaffold 1786,1	<u>Acvr2b-2</u> scaffold 4463	<u>P2ry1b-1</u> scaffold 61.338.1	<u>Adgrd2b</u> scaffold 195
	Poisson-zèbre	<u>Ednrba</u> ENSNDARP000001 11210	<u>Gpr37a</u> ENSNDARP00000 099643	<u>Ccr6a</u> ENSNDARP0000010 6824	<u>Acvr2b-2</u> ENSNDARP000001 33826	<u>P2ry1b</u> ENSNDARP000001 42040	<u>Adgrd2b</u> XP 009294636.1
Sarcoptérygiens	Cœlacanthe	<u>EDNRb</u> ENSLACP000000 14962	<u>GPR37</u> enslaccp000000 06305	<u>CCR6</u> Enslaccp000000234 29	<u>Acvr2b</u> enslaccp00000013 694	<u>P2RY1b</u> ENSLACP000000 02235	<u>Adgrd2b</u> XP 014344959.1
	Oiseaux	<u>EDNRb</u> ENSGALP000000 35729	<u>GPR37</u> ENSGALP00000 006305	<u>CCR6</u> ENSGALP00000031 194	<u>Acvr2b</u> Ensgalp00000009 931	<u>P2RY1b</u> ENSGALP000000 39217	
	Mammifères	<u>EDNRb</u> ENSMUSP000001 26057	<u>GPR37</u> ENSMUSP0000 0052185	<u>CCR6</u> ENSMUSP0000009 5029	<u>ACVR2b</u> Ensmusp000001 26108		

**Tableau 22 : Liste des orthologues aux différents gènes sélectionnés de poisson-zèbre chez les Gnastostomes.**

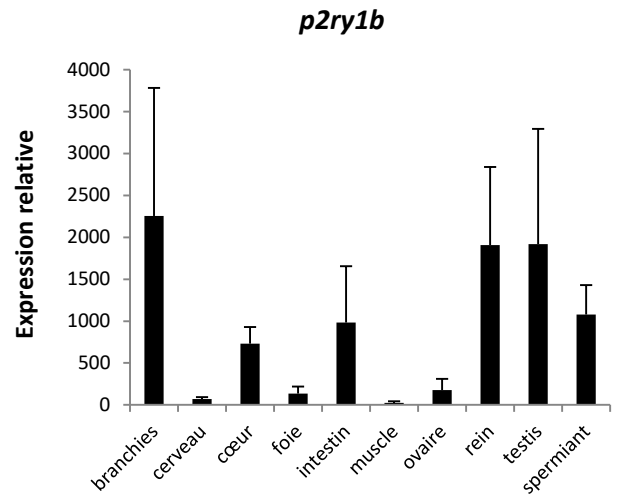
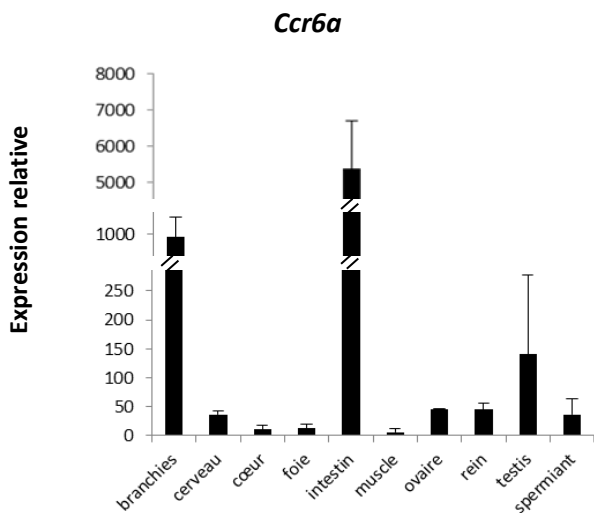
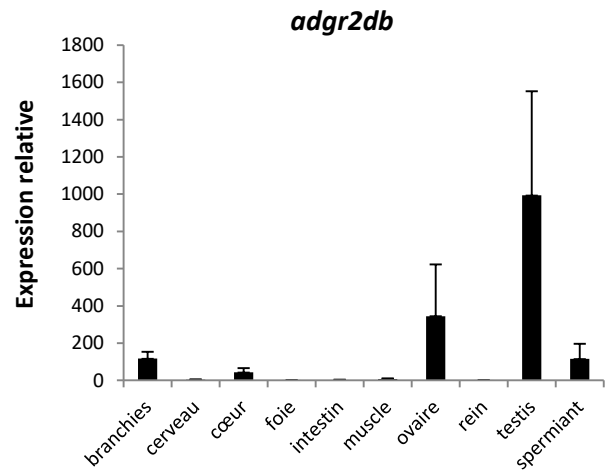
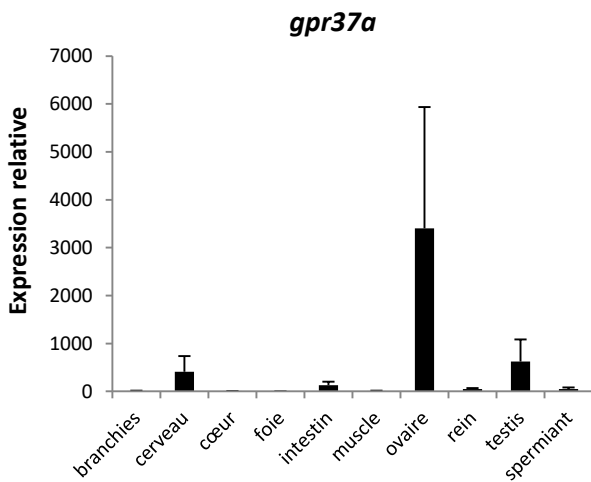
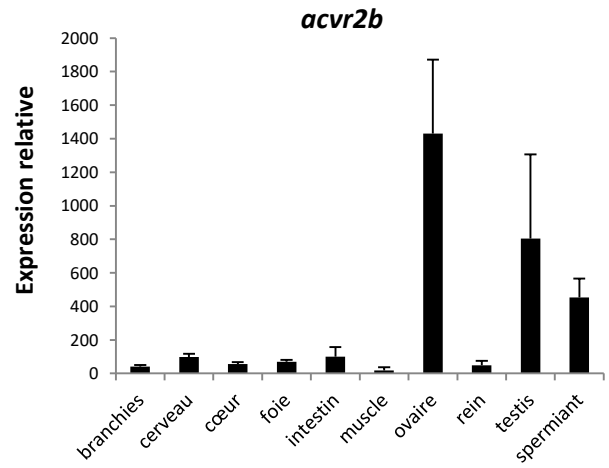
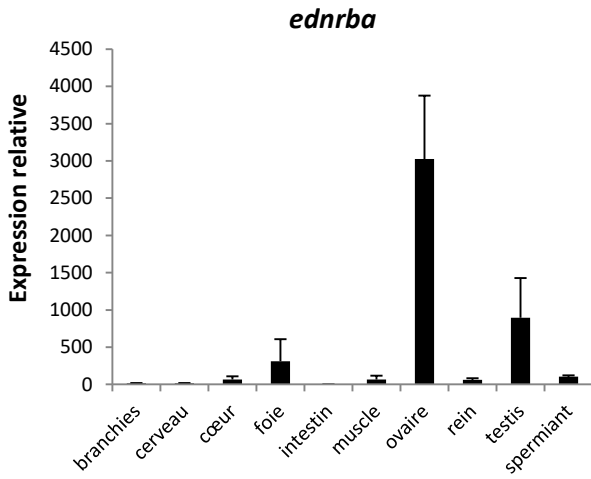
avec un autre groupe que nous avons annoté *Adgrd2b*. Il est intéressant de noter que ce groupe ne contient aucune espèce de Sarcoptérygien à l'exception du cœlacanthe. L'analyse de l'arbre phylogénétique montre que les gènes *adgrd2a* et *adgrd2b* sont apparus avant l'émergence des poissons chondrichthyens probablement lors de la duplication 2R du génome des poissons sans mâchoire. Il faut également noter qu'il n'y a pas eu de rétention de copies supplémentaires des gènes *adgrd2a* et *adgrd2b* suite aux duplications supplémentaires (3R et 4R) chez les poissons téléostéens.

## **2. Conservation du profil d'expression tissulaire et cellulaire chez la truite arc-en-ciel**

Les analyses phylogénétiques montrent que la plupart des gènes candidats, sélectionnés à partir des données de RNAseq chez le poisson-zèbre, sont bien conservés sur le génome des différents poissons téléostéens (tableau 22). Pour déterminer si cette conservation de structure des génomes était également accompagnée de la conservation du profil d'expression, nous avons voulu comparer les profils d'expression tissulaire et cellulaire des gènes orthologues entre le poisson-zèbre et la truite arc-en-ciel (figures 55 à 57). Étant donné la forte conservation des séquences des gènes de truite issues de la duplication 4R (environ 97\_99%), nous avons fait le choix de choisir des amorces de qPCR qui ne discriminent pas les transcrits des gènes ohnologues issus de cette duplication 4R.

### **2.1. Profil d'expression tissulaire**

Le patron d'expression tissulaire des gènes codants pour les récepteurs membranaires sélectionnés a été déterminé par qPCR sur des tissus de truites mâles juvéniles. Un échantillon de la gonade mâle, d'animaux sexuellement matures, a aussi été ajouté à notre panel (figure 55). Globalement, on constate que les gènes codants pour les récepteurs *Ednrba*, *Gpr37a*, *Adgrd2b* et *Acvr2b* restent préférentiellement exprimés dans les gonades de truite même si une expression de leur transcrit est parfois détectable dans d'autres tissus. Les transcrits codants pour les récepteurs *P2ry1b* et *Ccr6a* font figure d'exception, car ils sont accumulés



**Figure 55 : L'expression des récepteurs peut être préférentiellement observée dans les gonades, ou présentée un patron plus ubiquitaire.**

Le patron d'expression du transcrite des différents récepteurs d'intérêt est analysé par qPCR sur un échantillonnage de tissus de truite. L'expression relative est normalisée par l'ARN 18s. La distribution préférentielle des transcrits *ednrba*, *gpr37a*, *adgrd2b* et *acvr2b* semble bien marquée dans les gonades chez la truite. La distribution des transcrits *ccr6a* et *p2ry1b* est plus ubiquitaire puisque ces transcrits sont retrouvés en abondance dans de nombreux tissus.

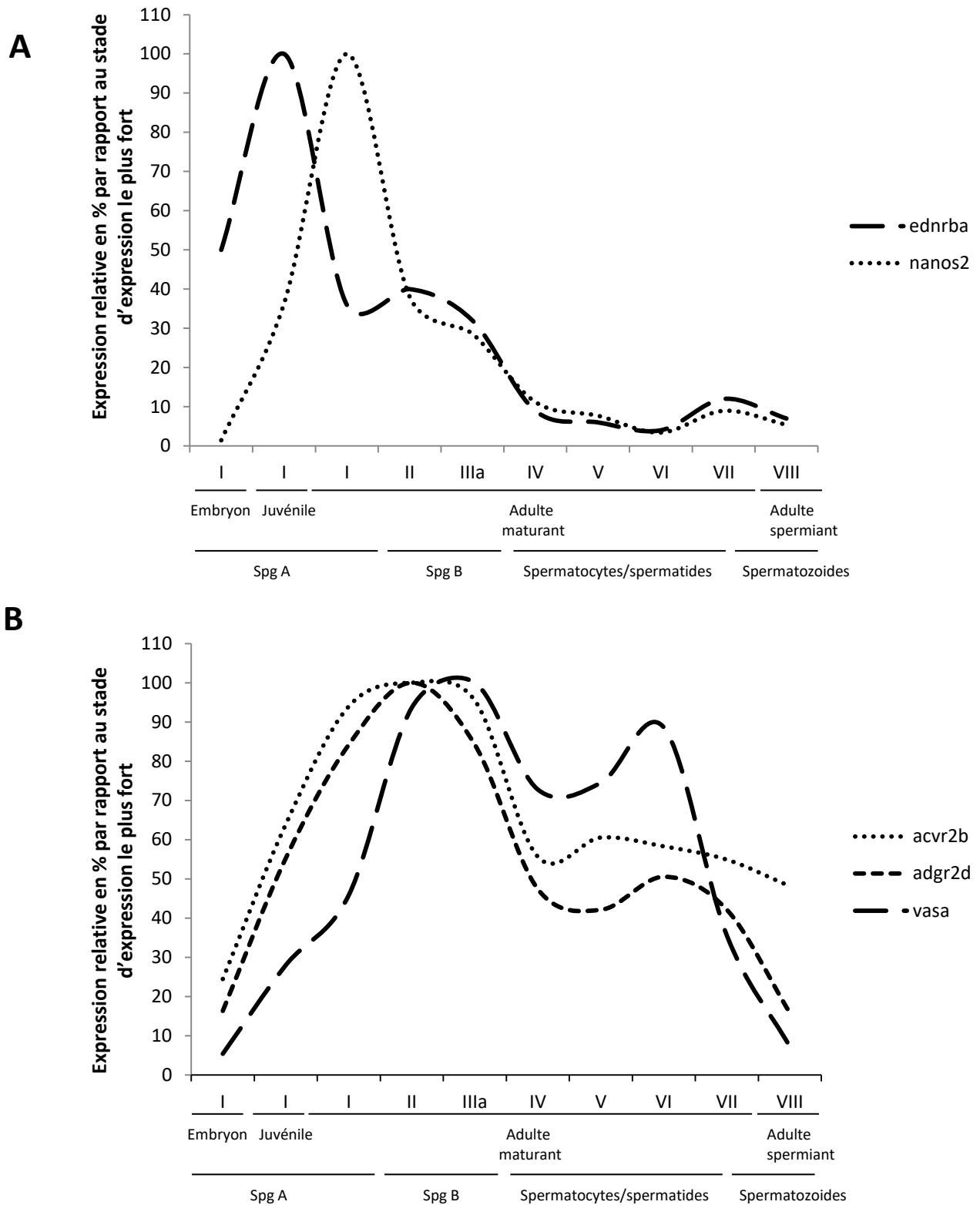


respectivement dans, le rein et les branchies d'une part, et dans l'intestin et le cerveau d'autre part (figure 55). De manière intéressante, l'expression relative des transcrits codants pour les récepteurs *Ednrba*, *Acvr2b*, et dans une moindre mesure *Gpr37a*, est plus élevée dans les ovaires que dans les testicules. Au contraire, le profil d'expression du transcrit du récepteur *Adrd2b* montre une spécificité testiculaire plus marquée comme chez le poisson-zèbre (non illustré). D'autre part, l'abondance relative de tous transcrits codants pour ces récepteurs diminue dans les testicules des mâles spermiantes (figure 55).

## **2.2. Profil d'expression gonadique au cours de l'ontogenèse**

Le profil d'expression des gènes a été précisé au cours de l'ontogenèse et au cours de la progression de la spermatogénèse à partir de gonades mâles de truite prélevées dans une population monosexue (figure 56). Globalement, l'abondance relative des transcrits codant pour *Adgrd2b*, *Gpr37a*, et *Acvr2b* augmente entre le stade larvaire et le stade juvénile pré-pubère, puis reste élevée jusqu'au stade gonadique III. Cette période, est caractérisée par la prolifération prédominante des spermatogonies A et B. Cette observation suggère que les transcrits des récepteurs ne sont probablement pas restreints aux seules spermatogonies indifférenciées. Le profil d'accumulation des transcrits *ccr6a* est assez similaire à ces récepteurs, à l'exception du dernier stade de la différenciation gonadique. Les transcrits *ccr6a* sont exprimés dès le stade larvaire et leur accumulation se maintient jusqu'au stade gonadique III. L'abondance relative des transcrits chute au cours de la méiose et de la spermiogénèse (stades IV à VIII), puis est restaurée au moment de la spermiation (stade VIII). Ces résultats suggèrent que les transcrits pourraient être accumulés non seulement dans les spermatogonies, mais aussi dans des cellules somatiques au moment de la spermiation (figure 56). Le profil des transcrits de *p2ry1b* est similaire à celui de *ccr6a* même si l'expression au stade larvaire est un peu moins marqué. On retrouve une expression importante au moment de la spermiation.

L'abondance relative du transcrit *ednrba* est déjà élevée au stade larvaire (55 jpf). Cette accumulation relative, augmente significativement chez le juvénile pré-pubère (90 jpf), puis diminue dès le début de la puberté (stades 1), pour plafonner entre les stades gonadiques I et III (initiation des proliférations de spermatogonies B



**Figure 56 : Schéma récapitulatif du patron d'expression des transcrits des récepteurs au cours de l'ontogénèse chez la truite.**

Pour chaque transcrite, l'expression la plus forte définit le seuil d'expression maximum (100%). En fonction des stades du développement gonadique (I à VIII), les populations de cellules germinales majeures évoluent significativement dans le testicule. Stade I, embryon et juvénile prépubère : on retrouve principalement des spermatogonies A. Chez les juvéniles entrant en puberté, les stades II et III se caractérisent par une majorité de spermatogonies B. Les stades gonadiques ultérieurs comportent une majorité de spermatocytes (stade IV, V, VI) et de spermatides et spermatozoïdes (stades VII et VIII). En A : représentation du patron d'expression de gène très précoces. En B : représentation de l'expression de gène ayant un patron plus large.

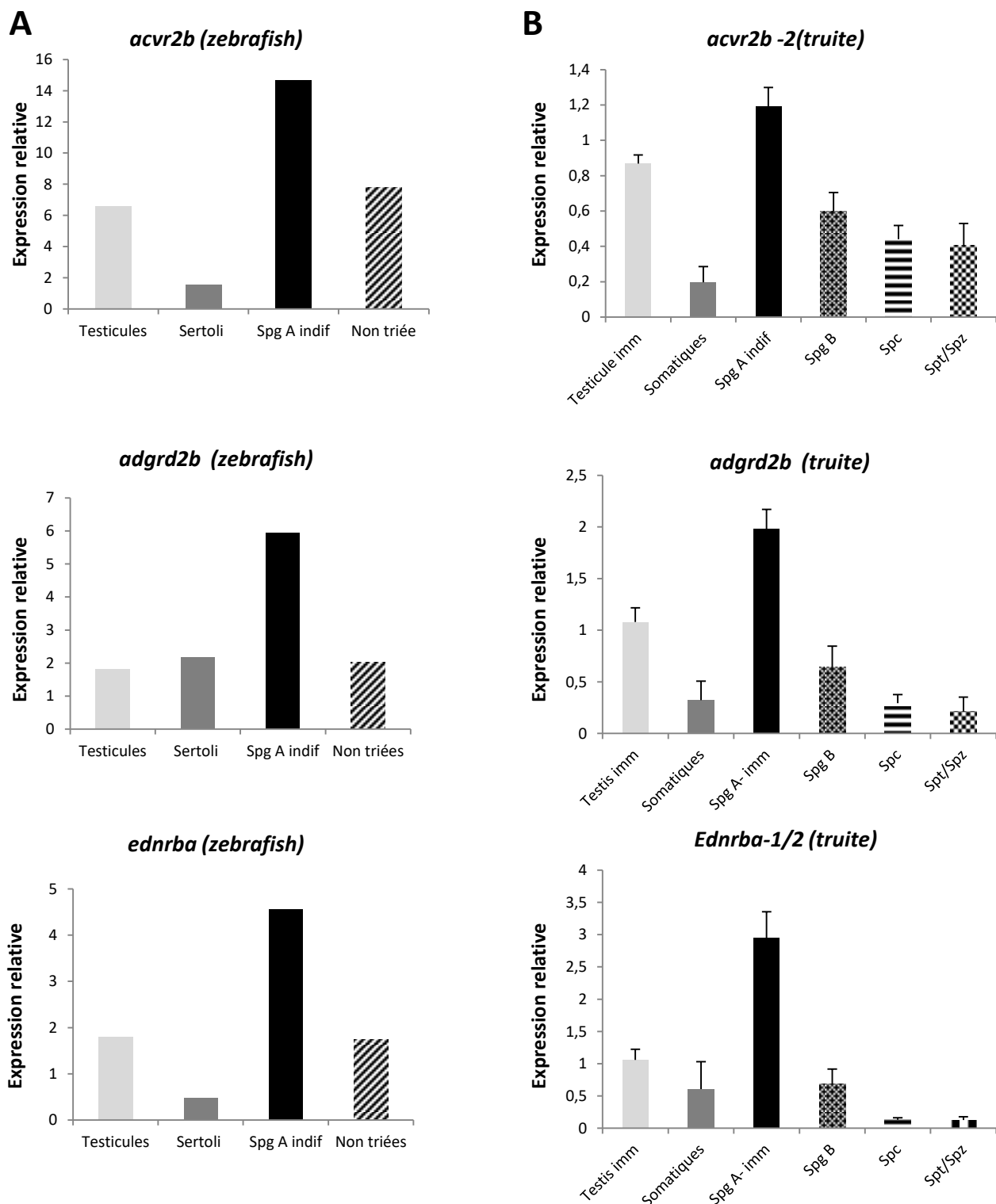
et entrée en méiose) avant de chuter très significativement au cours de la méiose et de la spermiogenèse (IV à VIII).

En résumé, les profils d'expression des transcrits des récepteurs *acvr2b-2*, *gpr37a* et *adgrd2b*, sont assez similaires à celui observé pour le gène *vasa*, ce qui suggère que ces récepteurs sont exprimés dans différentes populations de spermatogonies A. En revanche, il existe un « pic » d'accumulation des transcrits *ednrba* observé chez le juvénile pré-pubère autour de 90 jpf. Cette élévation brutale de l'expression des transcrits *ednrba* est plus précoce que celle des transcrits *nanos2* (marqueurs des cellules Apr chez le poisson-zèbre) qui est observé aux stades gonadiques I et II. Cette observation suggère que les transcrits *ednrba* sont exprimés dans une sous-population restreinte de spermatogonies indifférenciées antérieures aux cellules Apr (figure 56).

### **2.3. Profil d'expression cellulaire**

Étant donné la faible expression des gènes, le coût et la faible sensibilité de la technique d'hybridation d'ARNm *in situ* sur coupes testiculaires, nous avons utilisé une approche par qPCR pour déterminer la(es) location(s) cellulaire(s) des transcrits sélectionnés. Différentes fractions de cellules germinales purifiées à partir des animaux immatures de moins de 12 mois (spermatogonies A) ou d'animaux en cours de maturation (spermatogonies B, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes) ont été préparées. Les données montrent que les transcrits sélectionnés, *adgrd2b* et *acvr2b-2*, sont plus abondants dans la fraction enrichie en spermatogonies A par rapport aux spermatogonies B (augmentation d'un facteur 2 à 2.5). L'accumulation relative des transcrits tend à décroître légèrement entre les spermatogonies B et les spermatocytes (figure 57). Ce profil d'expression, dans les cellules germinales, est cohérent avec le profil d'expression de ces gènes observé au cours de la différenciation gonadique avec le maintien d'un plateau d'expression entre les stades I et III (figure 57).

Les transcrits *ednrba* montrent un profil d'expression remarquablement différent. Ils sont plus nettement préférentiellement accumulés dans les spermatogonies A que dans les spermatogonies B (augmentation d'un facteur 4) et



**Figure 57 : L'expression de certain récepteur est élevé dans des fractions enrichies en spermatogonie A.**

Le patron d'expression du transcrite des différents récepteurs d'intérêt est analysé sur différentes fractions cellulaires, par Rnaseq chez le zebrafish (A) et par qPCR chez la truite (B). L'expression relative est normalisée par l'ARN 18s pour l'analyse qPCR.

leur abondance relative continue à décroître fortement dans les fractions enrichies en spermatozoïdes et spermatozoïdes. De plus, on constate que l'abondance relative des transcrits *ednrba* est bien plus élevée dans les spermatogonies A que dans le testicule d'animaux immatures. Cette différence est bien moins marquée pour les autres récepteurs. D'autre part, ce profil d'expression cellulaire est assez similaire à celui observé pour *nanos2*. Ces données et l'observation d'une augmentation plus précoce et plus transitoire des transcrits *ednrba* chez le juvénile pré-pubère, sont en faveur d'une expression plus restreinte de *ednrba* dans une sous-population de spermatogonies A indifférenciées (figure 57).

Globalement, le profil d'expression tissulaire des gènes *adgrd2b*, *acvr2b-2*, *gpr37a*, et *ednrba*, qui montre une expression parfois préférentielle dans les gonades et une expression cellulaire plus élevée dans les fractions enrichies de spermatogonies A indifférenciées de truite, est en accord avec les données obtenues chez le poisson-zèbre. En conséquence, les voies de régulations paracrines candidates, sélectionnées à partir des données du poisson-zèbre, pourraient se révéler être pertinentes pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du devenir des cellules spermatogoniales souches chez d'autres espèces de poissons téléostéens d'intérêt agronomique comme les salmonidés. Sans remettre en cause l'intérêt générique de la plupart des voies de régulation mis en avant dans cette étude, les analyses phylogénétiques montrent cependant, que la conservation de certains gènes devient moins systématique au cours de l'évolution du génome des sarcoptérygiens.

# **Discussion**

Dans un premier temps, mon travail de thèse avait pour but de caractériser d'un point de vue moléculaire et fonctionnel, une nouvelle population de spermatogonies indifférenciées chez le poisson-zèbre. Dans un second temps, je me suis intéressé aux mécanismes de régulation paracrine impliqués dans le contrôle du devenir des cellules souches germinales.

## **1. Caractérisation des spermatogonies fluorescentes de la lignée vasa :eGFPtol2.**

### **1.1. Le fragment promoteur (-1481/+506) du gène vasa ne possède pas toute l'information nécessaire pour mimer le patron d'expression du gène vasa endogène**

L'analyse du patron d'expression du transgène GFP dirigé par la région promotrice proximale du gène *vasa* couplé au premier intron, met en évidence une forte accumulation asymétrique des transcrits *gfp* dans une seule des deux spermatogonies indifférenciées formant un doublet. En revanche, une expression forte de la protéine GFP est observée dans ces cellules, mais aussi dans la deuxième spermatogonie du doublet, ainsi que dans des spermatogonies indifférenciées isolées. Notre étude montre la présence d'au moins un pont intercellulaire entre les spermatogonies formant des doublets, ce qui pourrait permettre des échanges de matériel cytoplasmique entre les deux cellules du doublet et notamment de protéines comme la GFP. Il est peu probable que l'expression de la protéine GFP apparaisse d'abord dans les spermatogonies isolées fluorescentes puis dans les spermatogonies en paires. En effet, aucun transcrit *gfp* n'est détecté dans des spermatogonies isolées alors que l'accumulation de la protéine GFP dans ces cellules apparaît souvent aussi élevée que celle observée dans les spermatogonies en paire. L'hypothèse la plus probable est que la protéine GFP est d'abord produite dans les spermatogonies en doublet, puis ces cellules se séparent, probablement suite à la rupture du pont intercellulaire, pour former des spermatogonies isolées. Ces cellules isolées migrent en s'éloignant progressivement l'une de l'autre, mais elles restent fluorescentes probablement grâce à une demi-vie plus longue de protéine GFP par rapport à celle de son transcrit.

Bien que la spécificité cellulaire d'expression du transcrit *gfp* et de la protéine GFP dans les spermatogonies indifférenciées, soit conforme à celle du transcrit *vasa* endogène, le profil d'expression cellulaire du transgène apparaît bien plus restreint que celui des transcrits *vasa* endogènes puisque ce dernier s'étend à des populations de spermatogonies bien plus différenciées de type B. D'autres lignées *vas:eGFP*, exprimant le transgène GFP sous le contrôle d'un fragment promoteur du gène *vasa* et associant la région 3'UTR, ont montré un profil d'expression de la fluorescence plus étendue et qui décroît des spermatogonies indifférenciées aux spermatogonies différenciées de type B (Krøvel and Olsen, 2002; Nóbrega et al., 2010). Cela suggère que la construction testée dans notre étude ne possède pas toute l'information nécessaire à l'expression ou à l'accumulation des transcrits *vasa* endogènes. Il est bien admis que la région 3'UTR, se trouvant entre le codon-stop et le signal de polyadénylation (poly A), peut fixer des protéines qui stabilisent les transcrits en les protégeant d'une dégradation par des endonucléases (Matoulkova et al., 2012; Moore, 2005). Il est probable que l'absence de la région 3' UTR du gène *vasa* dans les lignées *Dr\_vasa:eGFPtol2* ne permet pas de stabiliser un stock suffisant de transcrits *gfp* capable d'être détecté au-delà des populations de spermatogonies indifférenciées.

L'absence de la région 3' UTR dans la construction testée pourrait aussi expliquer l'absence d'expression de la GFP dans les PGC et les gonocytes indifférenciés des lignées *Dr\_vasa:eGFPtol2*. Dans le cas de la lignée *vas:eGFP*, dont le transgène inclue la région 3'UTR du gène *vasa*, l'expression de la protéine GFP est observée dans les PGC, mais seulement si les embryons proviennent d'une mère transgénique. Si les embryons sont générés à partir d'un père transgénique et d'une mère sauvage, les PGC ne sont plus fluorescentes. Cette particularité peut être expliquée par le rôle de la région 3'UTR du gène *vasa* qui permet la compartimentalisation des transcrits *vasa* dans le plasma germinal de l'ovocyte et la stabilisation de ce transcrit dans les cellules germinales de l'embryon. En conséquence, aucune des lignées transgéniques produites à ce jour et utilisant des régions régulatrices du gène *vasa*, n'a permis de détecter l'expression de novo de transcrits rapporteurs dans les PGC ou les gonocytes indifférenciés chez les poissons-téléostéens. Une première hypothèse pourrait être que les transcrits *vasa*, détectés dans les PGC et les gonocytes indifférenciés, sont exclusivement d'origine



maternelle. D'après les observations réalisées dans les lignées transgéniques Dr\_vasa :eGFPtol2, cette hypothèse implique que le stock des transcrits *vasa* endogènes, détectés dans les spermatogonies indifférenciées de l'adulte, serait régénéré lors de la formation des doublets de spermatogonies indifférenciées. Il paraît cependant incertain que le stock de transcrits *vasa* généré dans les doublets de spermatogonies soit suffisant pour expliquer leur présence à des niveaux encore élevés, mais décroissants, dans les spermatogonies différenciées générées ultérieurement par des mitoses successives. Une autre hypothèse pourrait être que d'autres régions régulatrices du gène *vasa*, localisées en amont ou en aval des fragments promoteurs testés à ce jour, seraient nécessaires pour garantir une transcription *de novo* des transcrits *vasa* dans les PGC de l'embryon, les gonocytes indifférenciés des alevins, les SCC et les spermatogonies différenciées de l'adulte.

L'expression forte du transgène GFP, observée dans les lignées Dr\_vasa :eGFPtol2, pourrait être expliquée par la présence sur le transgène de régions régulatrices localisées en amont du site d'initiation de la transcription du gène *vasa*, mais aussi de celles présentes dans le premier intron. En effet, des travaux récents ont montré que le premier intron du gène *vasa* de medaka contient un enhancer de 35 pb qui permet une expression élevée d'un transgène GFP dans les PGC (Li et al., 2015). Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence la conservation de séquence de cet enhancer sur les régions génomiques du gène *vasa* du poisson-zèbre. Bien que notre étude ait permis de restreindre un peu plus les régions génomiques nécessaires pour une expression du transgène dans les spermatogonies du poisson-zèbre, d'autres investigations seront nécessaires pour délimiter davantage les régions régulatrices et identifier les facteurs de transcription associés et nécessaires pour cette expression cellule-spécifique.

### **1.2. L'expression asymétrique des transcrits *gfp* confirme l'existence de divisions asymétriques des spermatogonies indifférenciées chez le poisson-zèbre adulte**

La classification des différents types cellulaires observés lors de la spermatogenèse, a été principalement réalisée sur la base de critères morphologiques tels que la structure du nucléole ou la quantité d'hétérochromatines présente dans le noyau. La faible proportion d'hétérochromatines est une des

caractéristiques des cellules les plus indifférenciées comme les cellules souches. C'est bien évidemment le cas pour les cellules souches spermatogoniales de mammifères et de poissons (Francastel et al., 2000). En effet, la condensation de la chromatine, qui a pour conséquence d'inhiber l'expression de gènes inutiles dans les cellules, serait associée à la différenciation cellulaire. Ceci explique pourquoi l'aspect de la chromatine a été utilisé comme marqueur morphologique des différents types cellulaires de la spermatogenèse. Cela a permis chez les mammifères d'identifier les spermatogonies indifférenciées (As, Apr, Al), intermédiaires, et B. Les mêmes critères ont été appliqués pour les cellules germinales de poissons, même si les nomenclatures utilisées restent hétérogènes. Chez le poisson-zèbre, une première classification des populations de spermatogonies indifférenciées a été proposée par le Pr Rüdiger Schulz (Schulz et al., 2010). Cette classification se base essentiellement sur la taille des noyaux, l'état de compaction de l'hétérochromatine et la structure du nucléole. Elle propose 2 types de spermatogonies indifférenciées. Les spermatogonies indif\* qui sont de grosses cellules avec un nucléole bilobé et les spermatogonies indif avec un nucléole unique. Les spermatogonies formant des groupes de 2 spermatogonies A sont dites différenciées (Adiff). Elles sont légèrement plus petites, avec un noyau un peu plus dense et petit laissant apparaître quelques points d'hétérochromatine, une enveloppe nucléaire régulière arrondie, et 2 ou 3 petits lobes du nucléole. Cependant, les travaux de Schulz ont aussi permis de visualiser des spermatogonies indif\* en ciste avec un autre type de spermatogonie, suggérant la possibilité de divisions dites asymétriques (Schulz et al., 2010). Nos analyses en microscopie confocale et électronique à transmission des cellules de la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2 confirme la présence de doublets asymétriques chez le poisson-zèbre adulte. Nos observations montrent que l'ultrastructure des cellules impliquées dans des doublets est variable. On y retrouve des cellules de type A indif\* ou indif associées ou non à des spermatogonies plus différenciées. Ces mécanismes de divisions asymétriques ont été particulièrement bien mis en avant chez la drosophile (Yamashita and Fuller, 2008). Chez les vertébrés, c'est le modèle de la division symétrique des spermatogonies indifférenciées qui prime. Cependant, quelques travaux soulignent la possibilité de division asymétrique chez les mammifères comme la souris (Nakagawa et al., 2007; de Rooij and Russell, 2000). Avant notre étude, il n'y avait aucune évidence que cette asymétrie pouvait être induite ou être suivie d'une expression asymétrique d'un gène. De ce point de vue, le

profil d'expression des transcrits *gfp* décrit pour la première fois dans cette étude est unique et il suggère que les deux spermatogonies formant un doublet peuvent avoir des capacités d'expression génique bien distinctes. La très grande majorité des doublets de spermatogonies se sont révélés être fluorescents dans la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2. Il apparaît donc que la division asymétrique joue un rôle central dans le processus de renouvellement du stock de SSC chez le poisson-zèbre adulte comme précédemment proposé chez la drosophile.

**1.3. Les spermatogonies en paire du poisson-zèbre présentent une signature moléculaire similaire, mais pas identique à celle des SCC des autres poissons ou des SSC mammaliennes.**

Au cours du projet de thèse, nous avons d'abord engagé une étude de l'expression spatiale de nombreux marqueurs (intracellulaires et membranaires) de SSC, identifiés précédemment chez les mammifères ou proposés chez les poissons, afin de caractériser les cellules spermatogoniales fluorescentes *in situ* par la technique d'hybridation *in toto* d'ARNm (WMISH). Nous avons pu identifier l'expression des transcrits *dnd* et *nanos2* dans les spermatogonies en paires en utilisant la technique WMISH en simple marquage. Le patron d'expression du gène *dnd*, chez le poisson-zèbre, semble plus restreint que celui décrit dans d'autres espèces de poissons. En effet, les transcrits *dnd* seraient exprimés dans les spermatogonies A chez le medaka (Liu et al., 2009), le thon (Yazawa et al., 2013) et l'esturgeon (Yang et al.). Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir de résultats en utilisant la technique WMISH en double marquage, pour éventuellement colocaliser les transcrits *gfp* et ceux codant pour *dnd* ou *nanos2*. La faible expression des marqueurs d'intérêt et la faible sensibilité de la technique WMISH ne nous ont pas permis de valider d'autres marqueurs candidats en simple ou double marquage.

Pour caractériser les spermatogonies fluorescentes, nous avons entrepris une caractérisation *ex vivo* de leur transcriptome. La procédure de purification des spermatogonies fluorescentes a été mise au point sur la base de travaux précédents, réalisés chez le poisson-zèbre (Hinfray et al., 2013; Nóbrega et al., 2010). Comme attendu, les analyses en qPCR et RNAseq montrent que les fractions de spermatogonies fluorescentes purifiées présentent un enrichissement des transcrits

codant pour de nombreux marqueurs spermatogoniaux (*vasa*, *dazl*, *tudor1*, *tudor9*, *piwil1*, *piwil2*...), alors que les transcrits de facteurs d'origine somatique sont absents ou sont fortement diminués (*gsdf*, *amh*, *insl3*, *cyp17a1*). De plus, on note un enrichissement plus marqué des transcrits *dnd* et *nanos2*, ce qui est en accord avec leur localisation dans les spermatogonies indifférenciées en paires. De manière intéressante, notre étude révèle que des transcrits codant pour des marqueurs de SSC chez les mammifères, sont bien enrichis dans les fractions des spermatogonies fluorescentes purifiées. Le plus reconnu d'entre eux code pour le facteur de transcription Id4, mais on retrouve aussi les transcrits *sall4*, *nanog*, *plzfb* et *thy1b*. L'enrichissement des transcrits *id4* dans la fraction purifiée doit être particulièrement souligné, car Id4 est considéré comme l'un des marqueurs des plus spécifiques pour les SSC mammaliennes (Oatley et al., 2011). Il n'a pas encore été très étudié chez les poissons. Des travaux réalisés chez le poisson-chat mettent en avant une expression d'Id4 dans les spermatogonies, sans pouvoir donner plus de précision sur le type cellulaire exprimant ce marqueur (Shang et al., 2015). La présence du gène *nanog* est aussi remarquable, car il s'agit d'un marqueur nécessaire à la maintenance du caractère de pluripotence des cellules souches embryonnaires (Mitsui et al., 2003). Il est aussi important pour le développement gonadique (Chambers et al., 2007; Kehler et al., 2004; Yamaguchi et al., 2009). Chez le porc, le gène *Nanog* est fortement exprimé dans les gonocytes et les spermatogonies indifférenciées alors que *oct4/pou5f1* est absent de ces cellules (Goel et al., 2008). Des travaux récents chez la souris suggèrent que la différenciation des SSC adultes à partir des PGC est accompagnée d'une baisse des capacités de multipotence qui serait due à une baisse d'expression du gène *nanog*. Les niveaux relativement élevés du gène *nanog* dans les SSC pourraient expliquer les propriétés de multipotence des SSC mammaliennes. En effet, la transplantation des SSC de souris dans la moelle osseuse entraîne leur transdifférenciation en cellules souches hématopoïétiques (Ning et al., 2010). D'autres études montrent que les SSC peuvent se différencier en cardiomyocytes ou en neurones fonctionnels par exemple. Il est possible que l'expression de *nanog* soit nécessaire à la bipotence des SSC de poissons qui se traduit, après transplantation et colonisation de la gonade, par la capacité de générer des gamètes mâles ou femelles selon le sexe de l'animal receveur (Okutsu et al., 2006). L'analyse du transcriptome a aussi révélé l'enrichissement du gène *sall4*. Cette protéine est aussi exprimée dans les

spermatogonies indifférenciées des mammifères et elle est connue pour interagir avec *nanog* pour réguler de nombreux gènes dans les cellules souches embryonnaires multipotentes de souris (Wu et al., 2006). L'enrichissement d'un transcrite codant pour des enzymes de méthylation de novo de l'ADN orthologue de DNMT3b est observé dans les spermatogonies fluorescentes purifiées. Cette enzyme de méthylation de l'ADN qui est exprimée dans les spermatogonies indifférenciées des mammifères régule négativement l'activité transcriptionnelle du gène *nanog* (Li et al., 2007).

Globalement, le transcriptome des spermatogonies fluorescentes purifiées est cohérent avec le profil d'expression de gènes clés dans les SSC de mammifères. Il existe cependant quelques exceptions notables. On note l'absence d'expression des gènes *gfra1a* et *gfra1b* qui sont essentiels au renouvellement des SSC de mammifères. L'expression de gènes codants pour ce type de récepteur a aussi été notée chez certains poissons comme le tilapia (Santos Nassif Lacerda et al., 2013), la truite (Bellaïche et al., 2014) et la roussette (Bosseboeuf et al., 2014). Il est donc assez étonnant de ne pas le retrouver chez le poisson-zèbre. Aucune expression de *c-ret*, ou du ligand GDNF n'a été détectée dans les testicules du poisson-zèbre. En conclusion, si cette voie de signalisation a l'air très importante pour le développement du système cérébral (Shepherd et al., 2001, 2004) chez le poisson-zèbre, elle ne semble pas avoir conservé son rôle de régulation spermatogénétique. Il est aussi important de noter que bien que *Gfra1* soit retrouvé exprimé dans toutes les spermatogonies A indifférenciées, son expression diminue progressivement chez la souris (Nakagawa et al., 2010 and Suzuki et al., 2009). On notera aussi que des populations de spermatogonie indifférenciées n'exprimant pas le *Gfra1* sont bien présentes chez le tilapia (Santos Nassif Lacerda et al., 2013) et les rongeurs. Chez les rongeurs, cette population de spermatogonie n'exprimant pas *Gfra1* est quand même capable de former des colonies lorsqu'elles sont transplantées au sein d'un animal receveur (Grisanti et al., 2009). Une autre absence notable concerne *pou2*, l'orthologue d'Oct4/Pou5F1 mammalien. Nous n'avons pas réussi à identifier l'expression de ce gène dans la fraction de spermatogonies fluorescentes triées alors qu'il semble être exprimé dans les spermatogonies indifférenciées chez la truite (Bellaïche et al., 2014). Il est aussi présent dans les spermatogonies précoces du tilapia, de la roussette et du poisson-chat (Bosseboeuf et al., 2014; Huang et al.,

2016; Santos Nassif Lacerda et al., 2013; Shang et al., 2015). Néanmoins, des travaux mettent en avant que les protéines possédant le domaine Pou2 seraient impliquées dans l'initiation de la pluripotence cellulaire sauf chez le poisson-zèbre (Tapia et al., 2012).

En résumé, le transcriptome des spermatogonies fluorescentes révèle que ces cellules pourraient être des SSC malgré quelques caractéristiques moléculaires différentes.

#### **1.4. Les spermatogonies fluorescentes en paires et/ou isolées font partie du pool de SSC**

Les expériences de transplantation des cellules spermatogoniales fluorescentes purifiées à partir de la lignée Dr\_vasa :eGFPto2, ont montré que ces cellules avaient les capacités de coloniser les gonades mâles et femelles, de proliférer et de se différencier pour produire les différents types de cellules gamétogénétiques conduisant à la production de gamètes mâles ou femelles fonctionnels. Dans nos conditions, l'efficacité de la technique de transplantation a été de l'ordre de 17% pour des embryons âgés de 16 jours. Elle est assez similaire à celle précédemment décrite chez le poisson-zèbre pour des conditions semblables comme l'âge des embryons receveurs (entre 15 et 16 jours) ou l'âge des animaux donneurs de cellules germinales souches (Wong et al., 2011, 2013). Chez d'autres espèces, comme la truite, cette efficacité peut atteindre 80%, mais les embryons sont injectés au moment de l'éclosion et avec une quantité plus importante de cellules germinales (Bellaïche et al., 2014). Des investigations supplémentaires pourraient permettre de vérifier que l'efficacité de la transplantation est supérieure chez les embryons de poisson-zèbre prélevés au moment, ou peu après l'éclosion. Chez le poisson-zèbre, l'efficacité de la transplantation des SSC adulte (cette étude), qui apparaît plutôt faible par rapport à d'autres espèces, semble en revanche assez similaire à celle obtenue lorsque des PGC sont transplantées (Riesco et al., 2014).

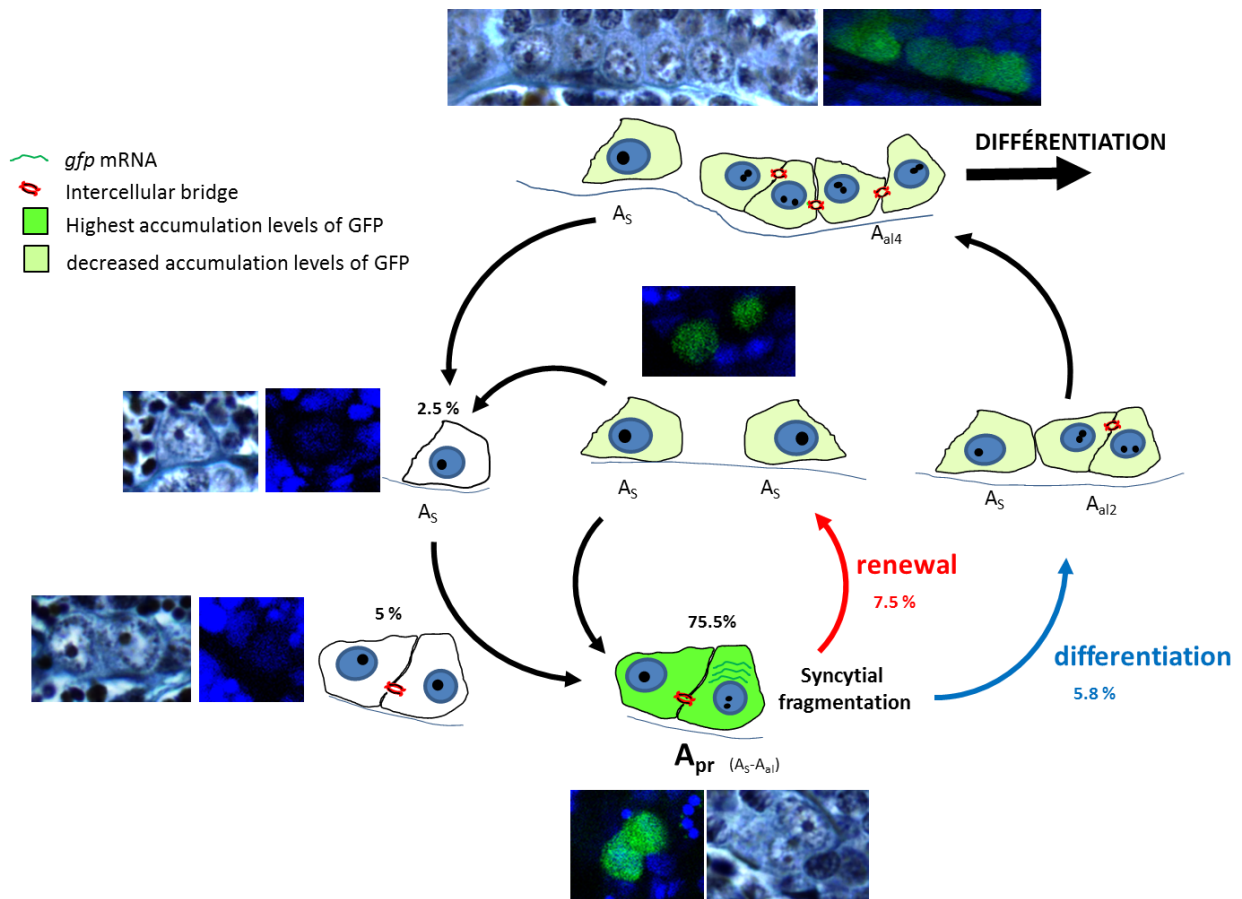
Les spermatogonies fluorescentes transplantées ont été capables de générer des spermatozoïdes ou des ovocytes fonctionnels en fonction du sexe de l'alevin receveur. Cette propriété de bipotence, des spermatogonies indifférenciées, est largement partagée chez de nombreuses espèces de poissons incluant la truite

(Okutsu et al., 2006), le poisson-zèbre (Nóbrega et al., 2010), le tilapia(Lacerda et al., 2010) et l'esturgeon (Pšenička et al., 2015).

Les résultats obtenus lors de la transplantation reflètent probablement les propriétés souches des spermatogonies fluorescentes en paires. En effet, d'après nos comptages *in situ* et l'analyse du transcriptome cellulaire, la fraction de spermatogonies isolées à partir de la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2 contient très majoritairement des spermatogonies qui étaient en paires avant la dissociation cellulaire (85%). Les spermatogonies fluorescentes isolées (type As) du testicule, mais issues de la fragmentation des doublets ne représentent que 4% des cellules fluorescentes. Cependant, on ne peut pas exclure qu'elles aient contribué de manière plus significative au succès de la transplantation. En conséquence, il nous est difficile de distinguer les propriétés fonctionnelles potentielles de spermatogonies fluorescentes en paires ou isolées. Le fait que ces deux types de cellules résistent à un agent cytotoxique, comme le busulfan, renforce l'idée que ces deux populations pourraient avoir des propriétés fonctionnelles de SSC.

### **1.5. Proposition d'un nouveau modèle hypothétique du processus de renouvellement des SSC chez le zebrafish adulte.**

L'ensemble des informations recueillies sur la localisation topologique, la morphologie, les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des cellules spermatogoniales fluorescentes de la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2, nous conduit à proposer un nouveau modèle hypothétique, mais plus dynamique, du processus de renouvellement des SSC chez le poisson-zèbre (figure 58). Chez les alevins, la multiplication des gonocytes encore indifférenciés passe par des divisions symétriques et le transgène *gfp* n'est pas exprimé. L'expression du transgène se met en place au cours de la transition pubertaire dans des doublets de spermatogonies indifférenciées chez le mâle. L'expression des transcrits *gfp* intervient dans une seule des deux spermatogonies indifférenciées formant un doublet, mais la protéine GFP diffuse dans les deux cellules qui communiquent par un pont intercellulaire. Ces cellules pourraient être considérées comme équivalentes aux cellules Apr des mammifères. Par la suite, les spermatogonies fluorescentes en doublet pourraient avoir deux destins différents : participation au renouvellement du stock de SSC ou



**Figure 58 : Modèles de régulation du pool de cellules souches spermatogoniales chez le poisson-zèbre.**

Le modèle proposé suggère que les spermatogonies indifférenciées en paire ( $A_{pr}$ ) vont pouvoir entrer en différenciation (flèche Bleue) mais conservent aussi des caractères souches leur permettant de se fragmenter afin de reformer des spermatogonies  $A_S$  (flèche rouge). De manière similaire à ce qui est observé chez les mammifère on peut imaginer que les spermatogonies alignées ( $A_{al}$ ) possèdent aussi la capacité de se fragmenter.



production de spermatogonies plus différenciées. Dans un contexte de renouvellement, les spermatogonies fluorescentes en paires pourraient se séparer suite à la rupture du pont cytoplasmique, un processus appelé fragmentation clonale (figure 58). Le devenir de ces cellules fluorescentes isolées reste incertain. Il est possible qu'elles soient rapidement recrutées pour former de nouvelles paires de spermatogonies asymétriques (Apr), ou qu'elles retournent à un état de quiescence avec une perte progressive de la fluorescence. Dans un contexte de différenciation, les spermatogonies en paires fluorescentes qui échappent à la fragmentation clonale pourraient continuer de se diviser pour former des chaînes de 4 spermatogonies A alignées qui restent proches de la paroi du tube séminifère (figure 58). Ces cellules deviennent beaucoup moins fluorescentes, car les transcrits *gfp* ne sont plus exprimés et le stock de protéines GFP est diminué de moitié à chaque division du fait de sa répartition dans des cellules filles et de la dégradation progressive de la protéine (demi-vie). Les cellules qui forment ces chaînes vont ensuite poursuivre leur programme de différenciation spermatogénétique. On ne peut cependant pas exclure que quelques spermatogonies se séparent des chaînes de 4 spermatogonies indifférenciées, par fragmentation clonale, pour alimenter aussi le stock de SSC. Ce modèle hypothétique n'exclut pas qu'une faible proportion de SSC soit aussi renouvelée par division symétrique (figure 58).

## **2. Identification des voies de régulation potentiellement impliquées dans le contrôle du devenir des SSC**

Les travaux antérieurs, réalisés notamment chez les rongeurs, ont montré que les cellules de Sertoli ont un rôle majeur dans l'ancrage des SSC et la formation d'une niche germinale au sein de laquelle il existe un microenvironnement favorable à la survie, au renouvellement ou à la différenciation des SSC. Chez la souris, plusieurs facteurs extracellulaires impliqués dans la régulation du devenir des SSC ont été identifiés et certains semblent avoir une origine Sertolienne. Chez les poissons-téléostéens, les informations sur les facteurs extrinsèques susceptibles de réguler le devenir des SSC, en agissant directement sur ces cellules, restent rares et parcellaires. Afin d'identifier ces facteurs clés chez les poissons, nous avons réalisé une analyse comparée du transcriptome des cellules spermatogoniales

indifférenciées et des cellules de Sertoli chez le poisson-zèbre pour rechercher les récepteurs susceptibles d'être exprimés par les SSC et capables de recueillir des signaux extracellulaires dont certains sont émis par les cellules de Sertoli.

### **2.1. Les spermatogonies indifférenciées du poisson-zèbre expriment de nombreux récepteurs nucléaires et protéines membranaires qui régulent le devenir des SSC chez les vertébrés**

Notre étude suggère la conservation de plusieurs voies de régulation paracrine déjà impliquées dans la régulation du devenir des SSC chez les vertébrés.

#### **Conservation de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque**

L'étude des récepteurs nucléaires exprimés au sein des cellules spermatogoniales indifférenciées, montre la présence de plusieurs récepteurs à l'acide rétinoïque, mais aussi de récepteurs orphelins apparentés. L'acide rétinoïque (AR), le métabolite actif de la vitamine A, est indispensable à la reproduction. Chez les rongeurs, une carence en vitamine A induit une dégénérescence de l'épithélium séminifère (Ghyselinck et al., 2006). Chez la truite arc-en-ciel, l'apport de vitamine A dans l'alimentation des truites est aussi nécessaire au maintien de leur fécondité (Fontagné-Dicharry et al., 2010). Chez le poisson-zèbre, l'inhibition de l'enzyme de synthèse de l'AR, la rétinaldéhyde dehydrogenase (RALDH1A2), par un agent pharmacologique nommé le WIN 18,446 induit une baisse du nombre de spermatozoïdes chez les individus traités, ainsi qu'une baisse de leur fécondité (Pradhan and Olsson, 2015). Chez les mammifères, il a été montré que les spermatogonies indifférenciées de type spermatogonies alignées (Aal) se différencient irréversiblement en spermatogonies de type A1 sous l'influence de l'acide rétinoïque (Gely-Pernot et al., 2015). Très récemment, il a été observé que l'AR serait également nécessaire à la différenciation des spermatogonies de Tilapia, mais les mécanismes sous-jacents son action restent encore mal connus (Feng et al., 2015). La présence de transcrits codant pour des récepteurs à l'acide rétinoïque dans les spermatogonies indifférenciées du poisson-zèbre, confirme que l'acide rétinoïque pourrait réguler directement le devenir des SSC, comme observé précédemment chez les mammifères. Chez ces derniers, l'acide rétinoïque nécessaire à ce processus est produit par les cellules de Sertoli (Li et al., 2009a). Il

en est probablement de même chez le poisson zèbre, car une expression des transcrits codant pour *aldh1a2* est aussi observée dans les cellules de Sertoli purifiées.

### **Conservation des voies de signalisation impliquant des TGF beta**

Notre étude révèle l'expression potentielle de plusieurs récepteurs qui pourraient être à la surface des cellules spermatogoniales indifférenciées. Parmi ces récepteurs, on retrouve des récepteurs aux TGFbeta.

Le transcrit codant pour le récepteur *Acvr2b-2* est préférentiellement exprimé dans les spermatogonies indifférenciées de poisson-zèbre et de truite, mais ces cellules expriment aussi les récepteurs *Acvr2b-a* et *Acvr2aa* au moins chez le poisson-zèbre. Les récepteurs aux TGFbeta de type 2 lient le ligand, mais ils interagissent avec un co-récepteur de type 1 pour transmettre le signal à l'intérieur de la cellule. On peut noter que le transcrit codant pour le co-récepteur *Acvr1ba* est aussi détecté dans les spermatogonies indifférenciées. Chez les mammifères, les récepteurs *Acvr2b* et *Acvr2a* sont présents en copie unique sur le génome et se lient aux activines A, B, et AB. Notre étude montre également que les transcrits codant pour les sous-unités *Inhbb* et *Inhba* sont bien exprimés dans les cellules de Sertoli purifiées chez le poisson-zèbre. Il semble donc que les activines pourraient agir sur les spermatogonies indifférenciées chez cette espèce. Des travaux antérieurs suggèrent que les activines stimulent la prolifération des spermatogonies indifférenciées non seulement chez les poissons, mais aussi chez les mammifères. Chez l'anguille, les protéines recombinantes humaines des activines A et B stimulent la prolifération des spermatogonies (Miura et al., 1995). Chez les mammifères, l'activine A joue un rôle crucial, en association avec BMP4, dans la détermination des PGCs et elle stimule la prolifération des spermatogonies chez le rat âgé de 3 jours (Meehan et al., 2000).

Nos données montrent que le transcrit du co-récepteur *Bmpr1bb* (également appelé *Alk6b*) est exprimé principalement dans les spermatogonies indifférenciées et plus modestement dans les cellules de Sertoli de poisson-zèbre. De manière intéressante, l'inactivation de ce récepteur *alk6b* chez le poisson-zèbre conduit à une sur-prolifération de spermatogonies indifférenciée et à une tumeur testiculaire (Neumann et al., 2011). L'absence de l'expression du récepteur *bmpr1l* dans les

spermatogonies indifférenciées suggère que cet effet pourrait être indirect et médié par les cellules de Sertoli. Cependant, il ne faudrait pas exclure que le récepteur Alk6b puisse aussi interagir avec d'autres récepteurs aux TGF beta de type II comme Acvr2a ou Acvr2b (Mazerbourg et al., 2005).

La spécificité de liaison des récepteurs Acvr2a et Acvr2b n'est pas restreinte aux activines et il est possible que ces récepteurs lient d'autres membres de la famille des TGF beta qui pourraient alors avoir une action agoniste ou antagoniste. Par exemple, nous avons détecté les transcrits codant pour Gdf6a dans les cellules de Sertoli purifiées du poisson-zèbre. Chez les mammifères, il a été montré que ce facteur GDF6 est capable d'activer ALK6 en se liant à BMPRII ou à ACVR2A (Mazerbourg et al., 2005). Notre étude montre que de nombreux autres membres de la famille TGF beta sont exprimés au sein des cellules de Sertoli et pour lesquels il ne semble pas y avoir d'expression de récepteurs spécifiques dans les spermatogonies indifférenciées (Tableau 19). On ne peut donc pas exclure que ces facteurs puissent avoir aussi une action sur les spermatogonies indifférenciées en agissant via les récepteurs Acvr2a et Acvr2b. Cependant, pour les ligands de type BMP (Bmp7b, Bmp16, Bmp6) une expression très significative des transcrits Bmpr11b est détectée dans les cellules de Sertoli. Il paraît plus probable que ces facteurs régulent des fonctions testiculaires en agissant de manière autocrine sur les cellules de Sertoli comme cela semble être le cas pour l'Amh. Chez le medaka, il a été montré que l'inactivation du récepteur Amh, qui est présent sur les cellules de Sertoli, entraîne une augmentation de l'index mitotique des spermatogonies indifférenciées et une accumulation de ces cellules dans la lumière des tubules (mutant *hotei*). Chez le poisson-zèbre, le gène codant pour le récepteur de type II de l'Amh semble être absent du génome et d'autre part aucun transcrit correspondant à ce récepteur n'a été détecté à ce jour chez cette espèce.

### **Conservation des voies de signalisation impliquant les facteurs de croissance**

Nous avons détecté l'expression de transcrits codant pour les récepteurs des Igfs (Igfra et Igfrb) principalement dans les cellules de Sertoli, mais aussi dans les cellules spermatogoniales indifférenciées. De plus, l'expression du transcrit Igf2 est détectée principalement dans les cellules de Sertoli purifiées. Ces données sont cohérentes avec des travaux antérieurs, réalisés chez différentes espèces de

poissons (dont le poisson zèbre), qui montrent que les Igfs stimulent la prolifération des spermatogonies indifférenciées (Duan, 1998; Loir, 1999b; Morais et al., 2013b; Nóbrega et al., 2015; Reinecke et al., 2005). Chez la souris, il a été démontré que l'activation du récepteur igfr1 stimule la prolifération des SSC mises en culture, en permettant la progression G2/M du cycle cellulaire alors que GDNF et FGF2 stimulent l'entrée en phase S (Wang et al., 2015). Ces observations suggèrent que la voie de signalisation igf1r/Igf2 pourrait bien être active dans la niche germinale chez le poisson-zèbre pour stimuler la division des SSC.

### **Conservation des voies de signalisation impliquant des cytokines**

Nos données montrent que les transcrits codant pour les récepteurs Lifra et Lifrb sont exprimés principalement dans les cellules de Sertoli, mais aussi dans les spermatogonies indifférenciées. Chez les mammifères, le récepteur Lifr est présent en copie unique et fixe un ligand appelé leukemia inhibitory factor (LIF). Le facteur LIF est capable d'augmenter la formation de colonies de cellules souches germinales issues de testicules de souris prélevés avant la naissance (Kanatsu-Shinohara et al., 2007). Chez le poisson-zèbre, le LIF est également capable de favoriser la prolifération des gonocytes indifférenciés (Wong and Collodi, 2013). Cette action du LIF pourrait aussi être limitée à la période précoce du développement du poisson-zèbre, car nous n'avons pas pu détecter l'expression du transcrit m17 (nom donné au LIF chez le poisson-zèbre) dans les cellules de Sertoli purifiées d'animaux adultes. Il est aussi possible que les conditions de culture sub-optimales utilisées dans notre étude puissent expliquer l'absence des transcrits dans les cellules de Sertoli purifiées, mais ces derniers ne sont pas détectés non plus dans les gonades mâles des animaux sexuellement matures ou dépourvus de cellules germinales.

Chez les mammifères, le Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) stimule la prolifération des PGC (Kawase et al., 1994). Nos données montrent que les transcrits Tnf $\alpha$  et Tnf $\beta$  sont détectés dans les cellules de Sertoli purifiées de poisson-zèbre. De plus, nous observons la présence de transcrits codant pour son récepteur potentiel Tnfrsf1 (deux paralogues chez le poisson-zèbre Tnfrsf1a et Tnfrsfa). Il semble donc bien que cette voie de régulation paracrine pourrait être conservée entre le poisson-zèbre et les mammifères.

### **Conservation des voies de signalisation impliquant des molécules d'adhésion**

Les protéines membranaires d'adhésion de la famille des Nectines sont importantes pour la spermatogenèse (Huang and Lui, 2016). Nos données indiquent qu'un transcrite codant pour l'une de ces protéines, nommée *cadm1a*, est fortement exprimé dans les spermatogonies purifiées du poisson-zèbre. Chez la souris, la protéine *Cadm1* est exprimée dans les SSC (Terada et al., 2010). La protéine *Cadm1* est impliquée dans des interactions homophiles et hétérophiles. Bien que son rôle reste à être précisé, elle serait impliquée dans l'adhésion entre les cellules germinales d'une part et/ou entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli d'autre part.

## **2.2. Certaines voies de régulation du devenir des SSC ne semblent pas conservées chez le poisson-zèbre**

Les études transcriptomiques de RNAseq et de qPCR n'ont pas permis de valider la conservation de la voie de régulation *Gfra1/Gdnf* chez le poisson-zèbre. En effet, les transcrits *gfra1a* et *gfra1b* ne sont pas détectés dans les cellules spermatogoniales purifiées et le transcrite *gdnf* n'est pas détecté dans les cellules de Sertoli purifiées. Les acteurs de cette voie de régulation majeure pour le renouvellement des SSC des mammifères ont pourtant été détectés chez la truite (Bellaïche et al., 2014; Nakajima et al., 2014). Une autre étude utilisant des anticorps hétérologues anti-*gfra1* a révélé la présence du récepteur *Gfra1* sur les spermatogonies du tilapia (Santos Nassif Lacerda et al., 2013b).

FGF2 est un facteur de croissance qui favorise l'action positive du GDNF sur le renouvellement des SSC mises en cultures chez certaines espèces mammaliennes. L'absence d'expression significative de transcrits codant pour le *Fgf2* dans les cellules de Sertoli purifiées, ainsi que l'absence des transcrits codant pour les récepteurs aux *Fgf* (Fibroblast Growth Factor) dans les spermatogonies indifférenciées du poisson-zèbre, doit aussi être notée. L'absence d'expression significative de ces transcrits a été confirmée par qPCR que ce soit sur la gonade mâle entière ou les fractions cellulaires purifiées.

Ces observations, suggèrent que la fonctionnalité de ces voies de signalisation intercellulaire pourrait être conservée chez certaines espèces de

vertébrés et pas d'autres, en l'occurrence le poisson-zèbre. Il est aussi possible que le niveau d'expression des transcrits soit très bas dans les testicules de poisson-zèbre et que les conditions de culture, ou de tri des cellules purifiées, n'aient pas été appropriées pour maintenir une expression significative des transcrits recherchés.

### **2.3. Identification de nouvelles voies de régulation candidates qui pourraient être impliquées dans le contrôle du devenir des SSC**

#### **Voie de régulation paracrine impliquant l'endothéline**

Les observations réalisées chez le poisson-zèbre, montrent que le transcrit d'un récepteur de l'endothéline, nommé *Ednrba*, est enrichi dans les spermatogonies indifférenciées purifiées de type Apr. De manière intéressante, le transcrit codant pour un ligand potentiel, nommé endothéline 2 (*Edn2*), est lui principalement exprimé par les cellules de Sertoli. L'analyse de l'expression des récepteurs *Ednrba* chez la truite, confirme que ce récepteur est très enrichi dans des spermatogonies A indifférenciées par rapport à des spermatogonies B engagées dans la différenciation spermatogénétique. Une augmentation marquée des transcrits codant pour *Edn2* et son récepteur *Ednrba* semble précédée celle du transcrit *Nanos2* qui est majoritairement exprimé dans des spermatogonies Apr au moment de la transition pubertaire. Ces observations suggèrent que l'expression des récepteurs *Ednrba* et leur activation potentielle par *Edn2* interviennent bien au moment où les spermatogonies sont encore indifférenciées chez la truite. A notre connaissance, il n'y a aucune information sur le profil d'expression cellulaire et la fonction des gènes *Edn2* et *Ednrba* dans les testicules de poissons.

Les gènes codants pour *Edn2* et son récepteur *Ednrb* sont conservés chez les vertébrés. L'expression des récepteurs *Ednra* et *Ednrb* a été bien décrite dans différentes cellules du testicule humain, mais pas dans les spermatogonies (Ergün et al., 1999). En particulier, *Ednrb* est exprimé dans les cellules de Leydig, les cellules péricubulaires, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les péricytes des capillaires sanguins. L'endothéline 2 exprimée par les cellules de la granulosa a été impliquée dans la contraction, au moment de l'ovulation, des cellules musculaires lisses qui entourent les follicules ovariens (Ling et al., 2013). Il est probable que l'endothéline 2 pourrait avoir un rôle similaire dans la contraction des

cellules musculaires lisses qui entourent les tubes séminifères. L'augmentation très importante des transcrits codant pour l'endothéline 2 dans le testicule de truite au moment de la spermiation semble en accord avec cette hypothèse.

La fonction des voies de régulation impliquant les ligands de type endothéline et leurs récepteurs a été étudiée dans différents contextes de renouvellement de cellules progénitrices multipotentes. A notre connaissance, il n'existe à ce jour aucune information sur l'implication potentielle de l'endothéline 2 dans un processus de renouvellement de cellules souches, ou progénitrices. Cependant, l'endothéline 3 est impliquée dans le renouvellement des progéniteurs des cellules gliales et mélanocytes (Trentin et al., 2004), et des progéniteurs de cellules nerveuses entériques (Bondurand et al., 2006). L'endothéline 1 (Edn1) est capable d'initier la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en progéniteurs communs aux lignages des chondrocytes et osteocytes (Tsai et al., 2015). Cette action passe par l'activation de la voie de signalisation AKT qui est une voie intrinsèque activée également par le Gdnf lors du renouvellement des SSC chez les mammifères.

Les cellules endothéliales constituent une niche pour certaines cellules souches comme les cellules souches hématopoïétiques du placenta (Raynaud et al., 2013). Les cellules endothéliales ont été utilisées avec succès comme couche cellulaire nourricière (feeder layer) pour maintenir la survie et le renouvellement des cellules souches embryonnaires de souris (Zhou et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que les SSC de lapin, cultivées *in vitro*, nécessitent non seulement le Gdnf, mais aussi une couche cellulaire nourricière (feeder layer) composée de cellules endothéliales (Kubota et al., 2011). Les cellules endothéliales sont connues pour sécréter l'endothéline, mais nous ne savons pas si l'effet bénéfique de ces cellules endothéliales observées sur les SSC de lapin est médié par cette molécule.

En résumé, nos observations, ainsi que les données de la littérature, suggèrent que les gènes *edn2* et *ednrba* pourraient constituer une voie de régulation paracrine impliquée dans la régulation du devenir des SSC au moins chez les poissons-téléostéens.

### **Voie de régulation impliquant des récepteurs purynergiques**



Les données obtenues chez le poisson-zèbre font ressortir deux transcrits codant pour les récepteurs purinergiques P2ry1b et P2ry4l, car ils sont enrichis dans les spermatogonies indifférenciées purifiées. Ces deux récepteurs appartiennent aux groupes des récepteurs purinergiques de type P2. Chez les mammifères, le récepteur P2ry1 est activé efficacement par l'ADP extracellulaire, mais aussi l'ATP extracellulaire. Le récepteur P2ry4l est activé efficacement par l'UDP extracellulaire. Ces deux récepteurs sont conservés chez les poissons-téléostéens. Les observations concernant le gène P2ry1b sont en accord avec des travaux réalisés antérieurement au laboratoire et qui ont montré que la prolifération des spermatogonies indifférenciées de truite pouvait être stimulée par l'ADP et l'ATP extracellulaire via l'action de récepteurs à l'adénosine de type A2 et P2 (Loir, 1999b, 2001). Il est intéressant de noter que cette étude montre que l'action stimulatrice de l'ADP et de l'ATP extracellulaire diminue lorsque la spermatogénèse est bien initiée, suggérant ainsi, que cet effet est probablement limité aux spermatogonies indifférenciées.

L'expression des récepteurs purinergiques de type P2 a été décrite à la surface de nombreuses cellules souches et ils ont été impliqués dans des interactions cellulaires qui contrôlent le devenir des cellules souches adultes (Kaebisch et al., 2015). Le récepteur P2RY1 est impliqué dans le maintien des capacités de prolifération des cellules souches neurales dans la zone ventriculaire du cerveau adulte chez les mammifères. Il permet aussi la différenciation de ces cellules souches en cellules progénitrices neuronales qui conservent des capacités de renouvellement plus limitées (Park et al., 2012). L'action combinée des récepteurs P2ry1 et P2ry4 permet aussi la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en préadipocytes en induisant l'expression de Ppar gamma qui à son tour permet la formation des gouttelettes lipidiques (Ciciarello et al., 2013). Des travaux récents ont montré que l'ATP extracellulaire entraîne une ouverture des canaux calciques dans les spermatogonies indifférenciées de souris, mais cette action passe par d'autres récepteurs purinergiques nommés P2rx (Fleck et al., 2016). Il n'existe aucune information sur la présence et le rôle potentiel des récepteurs de type P2 sur la biologie des SCC. De plus, l'analyse phylogénétique du gène P2ry1b montre qu'il est conservé sur le génome de certains oiseaux, mais aussi qu'il n'est pas présent sur le génome des différentes espèces de mammifères

étudiées (homme, rat, souris, bovin). Cette observation remet en cause la conservation de cette voie de régulation pour les spermatogonies indifférenciées des mammifères, mais le rôle du paralogue P2RY1a mériterait sans doute d'être étudié.

Nos travaux suggèrent qu'il existe des voies de signalisation purinergiques au sein des spermatogonies indifférenciées des poissons-téléostéens, mais leurs actions potentielles sur la survie, le renouvellement ou la différenciation de ces cellules devront être précisées. D'autre part, l'origine et la disponibilité temporelle de l'ADP et UTP extracellulaire, au sein de la niche germinale, devront être déterminées.

### **Voie de régulation impliquant l'adiponectine**

Plusieurs récepteurs de l'adiponectine sont exprimés dans les cellules de Sertoli et les cellules spermatogoniales purifiées, chez le poisson-zèbre (AdipoR1a, AdipoR1b et AdipoR2). La source d'adiponectine pourrait avoir une origine extra-gonadique car aucun des transcrits codant pour l'adiponectine A et B n'a été détecté dans notre étude. Chez le poisson-zèbre adulte, l'adiponectine A est exprimée dans le rein et l'adiponectine B est exprimée dans le foie, le tissu adipeux, les muscles, et le cerveau (Nishio et al., 2008). Chez les mammifères, l'adiponectine est exprimée dans les adipocytes et elle est détectée dans le sang.

La présence des récepteurs de l'adiponectine dans les gonades mâles est documentée chez le rat (Caminos et al., 2008) et le poulet (Ocón-Grove et al., 2008). Chez le poulet, les récepteurs AdipoR1 sont présents sur les cellules péricubulaires et les cellules de Leydig. En revanche, les récepteurs AdipoR2 sont exprimés dans les cellules de Leydig, mais aussi et surtout dans les cellules de Sertoli, les spermatides rondes et allongées et les spermatozoïdes. L'adiponectine inhibe la lipolyse et améliore le métabolisme énergétique dans les tissus en augmentant la sensibilité des cellules à l'insuline (Qiao et al., 2011). Le rôle de l'adiponectine dans la gonade mâle reste encore mal compris, mais elle constitue un lien potentiel qui relie la maturation sexuelle et l'utilisation des réserves énergétiques.

L'expression des transcrits codant pour les récepteurs de l'adiponectine dans les cellules spermatogoniales indifférenciées du poisson-zèbre, peut sembler atypique au regard des données d'expression détaillées précédemment chez le rat et

le poulet. Cependant, l'adiponectine a été impliquée dans des processus de renouvellement des cellules souches adultes. L'adiponectine stimule la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, tout en les maintenant dans un état indifférencié (DiMascio et al., 2007). De même, l'adiponectine favorise le renouvellement des cellules souches neurales (Song et al., 2015). A l'inverse, l'adiponectine inhibe le renouvellement des cellules épithéliales souches du sein chez la femme (Esper et al., 2015). Chez la drosophile, le récepteur adipoR est nécessaire au maintien des cellules souches germinales dans l'ovaire (Laws et al., 2015). Sur la base des données d'expression obtenues au cours de cette étude et des informations disponibles dans d'autres systèmes cellulaires, l'adiponectine et ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 constituent une voie de régulation paracrine candidate pour contrôler le devenir des SSC chez le poisson-zèbre.

### **3. Perspectives et conclusions**

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont contribué à démontrer qu'un fragment promoteur court du gène vasa était suffisant pour conférer une expression élevée d'un transgène dans des doublets de spermatogonies indifférenciées et cela de manière asymétrique. Il serait intéressant de délimiter davantage les régions génomiques responsables de cette expression cellulaire restreinte et asymétriques en générant de nouvelles lignées transgéniques porteuses de nouvelles constructions tronquées. Il s'agirait ensuite d'identifier les facteurs de transcription capables de se fixer dans les régions d'importance fonctionnelle par des techniques standards comme l'EMSA (electic mobility shift assays). Ceci pourrait conduire à l'identification de voies de régulations intrinsèques mises en place au moment de l'asymétrie des spermatogonies interconnectées, voire l'identification de voies de signalisations extrinsèques.

L'exploitation de la lignée Dr\_vasa eGFPTol2 nous a permis de caractériser une sous-population de spermatogonies indifférenciées en division, qui présentent l'originalité d'exprimer le transgène de manière asymétrique tout en restant interconnectées par un pont intercellulaire. Les spermatogonies en doublets conservent des propriétés morphologiques, moléculaires et fonctionnelles de cellules souches spermatogoniales. Le suivi de la fluorescence indique que les cellules du

doublet peuvent se séparer pour former des SSC isolées après la rupture du pont cytoplasmique, ou rester interconnectées pour former des chaînes de spermatogonies qui continueront probablement leur différenciation. En conclusion, nos travaux suggèrent que les spermatogonies indifférenciées en doublets constituent une entité cellulaire clef dans la dynamique de renouvellement du stock des SCC chez les poissons, comme précédemment proposés chez les insectes et les mammifères.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse nous amènent à considérer que la division asymétrique est un phénomène majeur dans le renouvellement du stock de SCC chez les poissons-téléostéens adultes. L'asymétrie des spermatogonies Apr a été bien documentée chez les invertébrés comme la drosophile, mais n'est pas le modèle dominant chez les vertébrés. Ce modèle dynamique du renouvellement asymétrique des SSC pourrait être mieux démontré par des approches d'imagerie *in vivo* en temps réel qui permettrait de visualiser la fragmentation du syncytium, la migration des cellules devenues isolées et enfin leur différenciation. La technique d'hybridation d'ARNm *in situ* ou *in toto* en double fluorescence pourrait être utile pour suivre l'origine et le devenir des cellules spermatogoniales indifférenciées en paire. Cependant, l'absence de marqueurs fiables des SSC isolées (type As) au stade prépubère et de marqueurs des spermatogonies engagées de type B sont des points limitants pour utiliser cette technique, sans parler de la faible sensibilité. En attendant la découverte de ces marqueurs, il serait intéressant de suivre l'origine et le devenir des cellules Apr fluorescentes en utilisant la technique de marquage multicolore et de traçage de lignage (système brainbow).

L'analyse du transcriptome des cellules spermatogoniales indifférenciées et des cellules de Sertoli, nous a permis de proposer de nouvelles voies de régulations candidates potentiellement impliquées dans le contrôle du devenir des SSC. L'un des futurs défis sera de mettre en œuvre les approches fonctionnelles qui permettront de valider leur implication. Dans cet objectif, des cultures d'explants testiculaires (poisson-zèbre ou truite), ou de spermatogonies indifférenciées (truite) pourront être stimulées avec les ligands appropriés seuls ou en combinaison avec des antagonistes des récepteurs. Les effets de ces ligands sur la prolifération et l'apoptose des spermatogonies indifférenciées seront étudiés par des techniques standards de marquage au BrdU ou au TUNEL, respectivement. L'utilisation des

gonades mâles issues des lignées Dr\_vasa :eGFPtol2 permettrait de mesurer plus facilement ces paramètres directement sur les doublets de spermatogonies indifférenciées. Le rôle des voies de régulation pourrait aussi être étudié par des invalidations des gènes d'intérêt (ligand et récepteur) *in vivo* dans la lignée Dr\_vasa:eGFPtol2 chez le poisson-zèbre grâce à la technique des CRISPR/Cas9. L'identification des voies de régulation paracrine du devenir des SSC devrait permettre de mettre au point des cultures à long terme des SSC, afin de les amplifier et de les utiliser dans un objectif de conservation et de régénération des ressources génétiques d'espèces d'intérêt agronomique ou d'espèces menacées d'extinction.

Les données transcriptomiques générées au cours de ce travail de thèse pourront aussi être exploitées pour rechercher des marqueurs membranaires des SSC conservés chez les poissons-téléostéens et qui pourraient permettre de faciliter leur isolement dans des espèces non transgéniques. De tels marqueurs pourraient être de très bons candidats pour le tri par FACS des SSC via l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre des composants de leur membrane plasmique. Pour le moment, nos recherches n'ont pas permis de visualiser de tels marqueurs par la technique d'hybridation *in toto* d'ARNm, mais il serait intéressant de persévérer dans l'optimisation de cette technique. Une autre alternative pourrait être la microdissection laser des cellules fluorescentes sur des coupes cryostat de gonades, car nous disposons de lignées supplémentaires de poisson-zèbre transgéniques exprimant la GFP dans différentes populations de cellules germinales (Gautier et al., 2013) ou somatiques (Gautier et al., 2011a) bien distinctes.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de proposer des voies de régulation paracrine, originales et conservées au cours de l'évolution pour certaines, impliquant ou non des facteurs d'origine Sertolienne, mais qui présentent pour la plupart un fort potentiel d'implication dans le contrôle du devenir des cellules spermatogoniales indifférenciées et notamment des SSC chez l'adulte.

# **Références** **bibliographiques**

-A-

- Abbasi, H., Tahmoorespur, M., Hosseini, S.M., Nasiri, Z., Bahadorani, M., Hajian, M., Nasiri, M.R., and Nasr-Esfahani, M.H. (2013). THY1 as a reliable marker for enrichment of undifferentiated spermatogonia in the goat. *Theriogenology* 80, 923–932.
- Adams, G.B., and Scadden, D.T. (2006). The hematopoietic stem cell in its place. *Nat. Immunol.* 7, 333–337.
- Adams, G.B., Chabner, K.T., Alley, I.R., Olson, D.P., Szczepiorkowski, Z.M., Poznansky, M.C., Kos, C.H., Pollak, M.R., Brown, E.M., and Scadden, D.T. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 439, 599–603.
- Aken, B.L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Banet, J.F., Billis, K., Girón, C.G., Hourlier, T., et al. (2016). The Ensembl gene annotation system. *Database* 2016, baw093.
- Aksnes, A., Gjerde, B., and Roald, S.O. (1986). Biological, chemical and organoleptic changes during maturation of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 53, 7–20.
- Albrecht, K.H., and Eicher, E.M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev. Biol.* 240, 92–107.
- Allard, E.K., Johnson, K.J., and Boekelheide, K. (1993). Colchicine disrupts the cytoskeleton of rat testis seminiferous epithelium in a stage-dependent manner. *Biol. Reprod.* 48, 143–153.
- Almeida, F.F.L., Kristoffersen, C., Taranger, G.L., and Schulz, R.W. (2008). Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel model of cystic germ cell development. *Biol. Reprod.* 78, 27–34.
- Alok, D., Hassin, S., Sampath Kumar, R., Trant, J.M., Yu, K., and Zohar, Y. (2000). Characterization of a pituitary GnRH-receptor from a perciform fish, *Morone saxatilis*: functional expression in a fish cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 168, 65–75.
- Alvarenga, É.R. de, and França, L.R. de (2009). Effects of Different Temperatures on Testis Structure and Function, with Emphasis on Somatic Cells, in Sexually Mature Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biol. Reprod.* 80, 537–544.
- Amer, M.A., Miura, T., Miura, C., and Yamauchi, K. (2001). Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol. Reprod.* 65, 1057–1066.
- Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* 116, 217–224.
- Aoki, Y., Nakamura, S., Ishikawa, Y., and Tanaka, M. (2009). Expression and syntenic analyses of four nanos genes in medaka. *Zoolog. Sci.* 26, 112–118.
- Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5319–5323.
- Asaoka, M., Sano, H., Obara, Y., and Kobayashi, S. (1998). Maternal Nanos regulates zygotic gene expression in germline progenitors of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* 78, 153–158.

-B-

- Baksa, K., Parke, T., Dobens, L.L., and Dearolf, C.R. (2002). The *Drosophila* STAT Protein, Stat92E, Regulates Follicle Cell Differentiation during Oogenesis. *Dev. Biol.* 243, 166–175.
- Ballow, D., Meistrich, M.L., Matzuk, M., and Rajkovic, A. (2006). *Sohlh1* is essential for spermatogonial differentiation. *Dev. Biol.* 294, 161–167.
- Barakat, B., O'Connor, A.E., Gold, E., de Kretser, D.M., and Loveland, K.L. (2008). Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reprod. Camb. Engl.* 136, 345–359.

- Barrios, F., Filipponi, D., Pellegrini, M., Paronetto, M.P., Di Siena, S., Geremia, R., Rossi, P., De Felici, M., Jannini, E.A., and Dolci, S. (2010). Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. *J. Cell Sci.* *123*, 871–880.
- Barrios, F., Filipponi, D., Campolo, F., Gori, M., Bramucci, F., Pellegrini, M., Ottolenghi, S., Rossi, P., Jannini, E.A., and Dolci, S. (2012). SOHLH1 and SOHLH2 control Kit expression during postnatal male germ cell development. *J. Cell Sci.* *125*, 1455–1464.
- Barroca, V., Lassalle, B., Coureuil, M., Louis, J.P., Le Page, F., Testart, J., Allemand, I., Riou, L., and Fouchet, P. (2009). Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo. *Nat. Cell Biol.* *11*, 190–196.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., and Lipshitz, H.D. (2001). Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7025–7028.
- Bautch, V.L. (2011). Stem cells and the vasculature. *Nat. Med.* *17*, 1437–1443.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* *87*, 245–313.
- Beer, R.L., and Draper, B.W. (2013). nanos3 maintains germline stem cells and expression of the conserved germline stem cell gene nanos2 in the zebrafish ovary. *Dev. Biol.* *374*, 308–318.
- Bellaïche, J. (2014). Vers l'identification des cellules souches spermatogoniales chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) : marqueurs, fonctions et voies de régulation. Thèse de doctorat. Université de Rennes 1.
- Bellaïche, J., Lareyre, J.-J., Cauty, C., Yano, A., Allemand, I., and Le Gac, F. (2014). Spermatogonial stem cell quest: nanos2, marker of a subpopulation of undifferentiated A spermatogonia in trout testis. *Biol. Reprod.* *90*, 79.
- Bellaïche, J., Goupil, A.-S., Sambroni, E., Lareyre, J.-J., and Le Gac, F. (2014). Gdnf-Gfra1 pathway is expressed in a spermatogenetic-dependent manner and is regulated by Fsh in a fish testis. *Biol. Reprod.* *91*, 94.
- Berishvili, G., D'Cotta, H., Baroiller, J.-F., Segner, H., and Reinecke, M. (2006). Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* *146*, 204–210.
- Betka, M., and Callard, G.V. (1998). Negative feedback control of the spermatogenic progression by testicular oestrogen synthesis: insights from the shark testis model. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *106*, 252-257-258.
- Bi, J., Li, Y., Sun, F., Saalbach, A., Klein, C., Miller, D.J., Hess, R., and Nowak, R.A. (2013). Basigin null mutant male mice are sterile and exhibit impaired interactions between germ cells and Sertoli cells. *Dev. Biol.* *380*, 145–156.
- Białas, M., Fiszer, D., Rozwadowska, N., Kosicki, W., Jedrzejczak, P., and Kurpisz, M. (2009). The role of IL-6, IL-10, TNF-alpha and its receptors TNFR1 and TNFR2 in the local regulatory system of normal and impaired human spermatogenesis. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* *62*, 51–59.
- Biggs, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7421–7426.
- Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dév.* *26*, 877–920.
- Billard, R., and Escaffre, A.-M. (1970). la spermatogenèse de poecilia reticulata. iii. – ultrastructure des cellules de sertoli. *ann. biol. anim. biochim. biophys.* *10*, 37–50.
- Billard, R., Jalabert, B., Breton, B., and Escaffre, A.-M. (1972). Les Cellules De Sertoli Des Poissons Téléostéens. I. — Etude Ultrastructurale. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* *12*, 19–32.
- Blackwell, T.K. (2004). Germ cells: finding programs of mass repression. *Curr. Biol. CB* *14*, R229-230.
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2006). Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 339–373.



- Blaser, H., Eisenbeiss, S., Neumann, M., Reichman-Fried, M., Thisse, B., Thisse, C., and Raz, E. (2005). Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. *J. Cell Sci.* *118*, 4027–4038.
- Blomberg Jensen, M., Jørgensen, A., Nielsen, J.E., Steinmeyer, A., Leffers, H., Juul, A., and Rajpert-De Meyts, E. (2012). Vitamin D metabolism and effects on pluripotency genes and cell differentiation in testicular germ cell tumors in vitro and in vivo. *Neoplasia N. Y. N* *14*, 952–963.
- Boettcher, P.J., Stella, A., Pizzi, F., and Gandini, G. (2005). The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. *Genet. Sel. Evol. GSE* *37*, 657–675.
- Boj, M., Chauvigné, F., and Cerdà, J. (2015). Coordinated Action of Aquaporins Regulates Sperm Motility in a Marine Teleost. *Biol. Reprod.* *93*, 40.
- Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D.G., and Cooke, H.J. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J. Cell Biol.* *176*, 741–747.
- Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N., and Pachnis, V. (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 2075–2086.
- Bontems, F., Stein, A., Marlow, F., Lyautey, J., Gupta, T., Mullins, M.C., and Dosch, R. (2009). Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr. Biol. CB* *19*, 414–422.
- Börner, A. (2006). Preservation of plant genetic resources in the biotechnology era. *Biotechnol. J.* *1*, 1393–1404.
- Bosseboeuf, A. (2013). Etude de l'auto-renouveau et de la différenciation des spermatogonies chez la petite roussette (*Scyliorhinus canicula* L.) et recherche du mode d'action de 5 peptides antiprolifératifs. Thèse de doctorat. Université de Caen Basse-Normandie.
- Bosseboeuf, A., Gautier, A., Auvray, P., Mazan, S., and Sourdain, P. (2014). Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *Reprod. Camb. Engl.* *147*, 125–139.
- Bothma, J.P., Magliocco, J., and Levine, M. (2011). The snail repressor inhibits release, not elongation, of paused Pol II in the *Drosophila* embryo. *Curr. Biol. CB* *21*, 1571–1577.
- Boyle, M., Wong, C., Rocha, M., and Jones, D.L. (2007). Decline in Self-Renewal Factors Contributes to Aging of the Stem Cell Niche in the *Drosophila* Testis. *Cell Stem Cell* *1*, 470–478.
- Braat, A.K., Zandbergen, T., Van De Water, S., Goos, H.J.T., and Zivkovic, D. (1999a). Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.* *216*, 153–167.
- Braat, A.K., Speksnijder, J.E., and Zivkovic, D. (1999b). Germ line development in fishes. *Int. J. Dev. Biol.* *43*, 745–760.
- Braat, A.K., van de Water, S., Goos, H., Bogerd, J., and Zivkovic, D. (2000). Vasa protein expression and localization in the zebrafish. *Mech. Dev.* *95*, 271–274.
- Brawley, C., and Matunis, E. (2004). Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science* *304*, 1331–1334.
- Brown, S., Hu, N., and Hombria, J.C.G. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr. Biol.* *11*, 1700–1705.
- Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., and Braun, R.E. (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* *36*, 647–652.
- Buehr, M., McLaren, A., Bartley, A., and Darling, S. (1993). Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *198*, 182–189.
- Bye, V.J., and Lincoln, R.F. (1986). Genetics in Aquaculture II Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* *57*, 299–309.

- de Caestecker, M. (2004). The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 1–11.
- Caminos, J.E., Nogueiras, R., Gaytán, F., Pineda, R., González, C.R., Barreiro, M.L., Castaño, J.P., Malagón, M.M., Pinilla, L., Toppari, J., et al. (2008). Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology* 149, 3390–3402.
- Campbell, B., Dickey, J.T., and Swanson, P. (2003). Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biol. Reprod.* 69, 2109–2117.
- Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev. Cell* 12, 503–514.
- Carr, I., Clegg, E.J., and Meek, G.A. (1968). Sertoli cells as phagocytes: an electron microscopic study. *J. Anat.* 102, 501–509.
- Carreau, S., and Hess, R.A. (2010). Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1517–1535.
- Cassel, M., Neves da Silva, D.F., and Ferreira, A. (2013). Cytoarchitectonical dynamic of Sertoli cells in *Melanorivulus punctatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Micron Oxf. Engl.* 1993 45, 115–118.
- Castranova, D., Lawton, A., Lawrence, C., Baumann, D.P., Best, J., Coscolla, J., Doherty, A., Ramos, J., Hakkesteeg, J., Wang, C., et al. (2011). The Effect of Stocking Densities on Reproductive Performance in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 8, 141–146.
- Chalmel, F., Lardenois, A., Evrard, B., Mathieu, R., Feig, C., Demougin, P., Gattiker, A., Schulze, W., Jégou, B., Kirchoff, C., et al. (2012). Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27, 3233–3248.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230–1234.
- Chan, F., Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Yang, Q.-E., Bieberich, C.J., Shashikant, C.S., and Oatley, J.M. (2014). Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes. *Genes Dev.* 28, 1351–1362.
- Charoensawan, V., Adryan, B., Martin, S., Söllner, C., Thisse, B., Thisse, C., Wright, G.J., and Teichmann, S.A. (2010). The impact of gene expression regulation on evolution of extracellular signaling pathways. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 2666–2677.
- Chaudhry, M.A., Vitalis, T.Z., Bowen, B.D., and Piret, J.M. (2008). Basal medium composition and serum or serum replacement concentration influences on the maintenance of murine embryonic stem cells. *Cytotechnology* 58, 173–179.
- Chauvigné, F., Boj, M., Finn, R.N., and Cerdà, J. (2015). Mitochondrial aquaporin-8-mediated hydrogen peroxide transport is essential for teleost spermatozoon motility. *Sci. Rep.* 5, 7789.
- Chawengsaksophak, K., Svingen, T., Ng, E.T., Epp, T., Spiller, C.M., Clark, C., Cooper, H., and Koopman, P. (2012). Loss of *Wnt5a* disrupts primordial germ cell migration and male sexual development in mice. *Biol. Reprod.* 86, 1–12.
- Chen, D., and McKearin, D. (2003). Dpp signaling silences *bam* transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. *Curr. Biol. CB* 13, 1786–1791.
- Chen, S.-R., and Liu, Y.-X. (2015). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reprod. Camb. Engl.* 149, R159-167.

- Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Zhao, G.-Q., Arber, S., Kurpios, N., Murphy, T.L., et al. (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* *436*, 1030–1034.
- Chen, L.-Y., Willis, W.D., and Eddy, E.M. (2016). Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 1829–1834.
- Chen, S.X., Bogerd, J., Schoonen, N.E., Martijn, J., de Waal, P.P., and Schulz, R.W. (2013). A progestin (17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* *185*, 1–9.
- Chen, Y., Hong, W.S., Wang, Q., and Chen, S.X. (2015). Cloning and expression pattern of gsdg during the first maleness reproductive phase in the protandrous *Acanthopagrus latus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* *217–218*, 71–80.
- Cherry, C.M., and Matunis, E.L. (2010). Epigenetic regulation of stem cell maintenance in the *Drosophila* testis via the nucleosome-remodeling factor NURF. *Cell Stem Cell* *6*, 557–567.
- Chieffi, P., Colucci-D'Amato, G.L., Staibano, S., Franco, R., and Tramontano, D. (2000). Estradiol-induced mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) activity in the frog (*Rana esculenta*) testis. *J. Endocrinol.* *167*, 77–84.
- Chieffi, P., Colucci D'Amato, L., Guarino, F., Salvatore, G., and Angelini, F. (2002). 17 beta-estradiol induces spermatogonial proliferation through mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1/2) activity in the lizard (*Podarcis s. sicula*). *Mol. Reprod. Dev.* *61*, 218–225.
- Chihara, M., Otsuka, S., Ichii, O., Hashimoto, Y., and Kon, Y. (2010). Molecular dynamics of the blood-testis barrier components during murine spermatogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* *77*, 630–639.
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., Ruggiero, C., Maggiolini, M., Andò, S., and Pezzi, V. (2012). 17 $\beta$ -Estradiol activates GPER- and ESR1-dependent pathways inducing apoptosis in GC-2 cells, a mouse spermatocyte-derived cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* *355*, 49–59.
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., and Pezzi, V. (2014). Role of estrogen receptors and g protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis. *Front. Endocrinol.* *5*, 1.
- Chiquoine, A.D. (1954). The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec.* *118*, 135–146.
- Chung, E.-Y. (2008). Ultrastructure of germ cells, the Leydig cells, and Sertoli cells during spermatogenesis in *Boleophthalmus pectinirostris* (Teleostei, Perciformes, Gobiidae). *Tissue Cell* *40*, 195–205.
- Ciciarello, M., Zini, R., Rossi, L., Salvestrini, V., Ferrari, D., Manfredini, R., and Lemoli, R.M. (2013). Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages. *Stem Cells Dev.* *22*, 1097–1111.
- Ciocca, D.R., and Roig, L.M. (1995). Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocr. Rev.* *16*, 35–62.
- Clermont, Y., and Bustos-Obregon, E. (1968). Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted “in toto.” *Am. J. Anat.* *122*, 237–247.
- Clevers, H., Loh, K.M., and Nusse, R. (2014). Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* *346*, 1248012.
- Costa, G.M.J., Avelar, G.F., Rezende-Neto, J.V., Campos-Junior, P.H.A., Lacerda, S.M.S.N., Andrade, B.S.C., Thomé, R.G., Hofmann, M.-C., and Franca, L.R. (2012). Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *PLoS One* *7*, e44091.
- Costa, Y., Speed, R., Ollinger, R., Alsheimer, M., Semple, C.A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Höög, C., Benavente, R., et al. (2005). Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J. Cell Sci.* *118*, 2755–2762.

Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., and Pandolfi, P.P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* 36, 653–659.

Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.-J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 20, 557–570.

Crespo, D., Assis, L.H.C., Furmanek, T., Bogerd, J., and Schulz, R.W. (2016). Expression profiling identifies Sertoli and Leydig cell genes as Fsh targets in adult zebrafish testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 437, 237–251.

Cuevas, M. de, and Matunis, E.L. (2011). The stem cell niche: lessons from the *Drosophila* testis. *Development* 138, 2861–2869.

#### -D-

Davies, O.R., Maman, J.D., and Pellegrini, L. (2012). Structural analysis of the human SYCE2-TEX12 complex provides molecular insights into synaptonemal complex assembly. *Open Biol.* 2, 120099.

De Felici, M., and Farini, D. (2012). The control of cell cycle in mouse primordial germ cells: old and new players. *Curr. Pharm. Des.* 18, 233–244.

DeFalco, T., Potter, S.J., Williams, A.V., Waller, B., Kan, M.J., and Capel, B. (2015). Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell Rep.* 12, 1107–1119.

Delalande, C., Goupil, A.-S., Lareyre, J.-J., and Le Gac, F. (2015). Differential expression patterns of three aromatase genes and of four estrogen receptors genes in the testes of trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Reprod. Dev.* 82, 694–708.

Deshpande, G., Calhoun, G., Yanowitz, J.L., and Schedl, P.D. (1999). Novel functions of nanos in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell* 99, 271–281.

Deshpande, G., Calhoun, G., and Schedl, P. (2004). Overlapping mechanisms function to establish transcriptional quiescence in the embryonic *Drosophila* germline. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1247–1257.

Deshpande, G., Willis, E., Chatterjee, S., Fernandez, R., Dias, K., and Schedl, P. (2014). BMP Signaling and the Maintenance of Primordial Germ Cell Identity in *Drosophila* Embryos. *PLOS ONE* 9, e88847.

Dhawan, J., and Rando, T.A. (2005). Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 15, 666–673.

DiMascio, L., Voermans, C., Uqoezwa, M., Duncan, A., Lu, D., Wu, J., Sankar, U., and Reya, T. (2007). Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 3511–3520.

Ding, J., Jiang, D., Kurczy, M., Nalepka, J., Dudley, B., Merkel, E.I., Porter, F.D., Ewing, A.G., Winograd, N., Burgess, J., et al. (2008). Inhibition of HMG CoA reductase reveals an unexpected role for cholesterol during PGC migration in the mouse. *BMC Dev. Biol.* 8, 120.

Dixon, K.E. (1980). The Origin of the Primordial Germ Cells in the Amphibia. *Neth. J. Zool.* 31, 5–37.

Dobson, M.J., Pearlman, R.E., Karaiskakis, A., Spyropoulos, B., and Moens, P.B. (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J. Cell Sci.* 107 ( Pt 10), 2749–2760.

Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 543–550.

Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Köprunner, M., Dörries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647–659.

Doyle, T.J., Kaur, G., Putrevu, S.M., Dyson, E.L., Dyson, M., McCunniff, W.T., Pasham, M.R., Kim, K.H., and Dufour, J.M. (2012). Immunoprotective properties of primary Sertoli cells in mice: potential functional pathways that confer immune privilege. *Biol. Reprod.* 86, 1–14.

Duan, C. (1998). Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *J. Nutr.* 128, 306S–314S.

Dumasia, K., Kumar, A., Deshpande, S., Sonawane, S., and Balasinor, N.H. (2016). Differential roles of estrogen receptors, ESR1 and ESR2, in adult rat spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 428, 89–100.

Durcova-Hills, G., Tang, F., Doody, G., Tooze, R., and Surani, M.A. (2008). Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS One* 3, e3531.

#### -E-

Eddy, E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* 43, 229–280.

Eguizabal, C., Boyano, M.D., Díez-Torre, A., Andrade, R., Andollo, N., De Felici, M., and Aréchaga, J. (2007). Interleukin-2 induces the proliferation of mouse primordial germ cells in vitro. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 731–738.

Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N. r., Porter, M., and Gadd, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* 61, 493–531.

Engel, K.B., and Callard, G.V. (2007). Endocrinology of Leydig Cells in Nonmammalian Vertebrates. In *The Leydig Cell in Health and Disease*, A.H. Payne, and M.P. Hardy, eds. (Humana Press), pp. 207–224.

Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., and Parichy, D.M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21–40.

Ergün, S., Harneit, S., Paust, H.J., Mukhopadhyay, A.K., and Holstein, A.F. (1999). Endothelin and endothelin receptors A and B in the human testis. *Anat. Embryol. (Berl.)* 199, 207–214.

Esper, R.M., Dame, M., McClintock, S., Holt, P.R., Dannenberg, A.J., Wicha, M.S., and Brenner, D.E. (2015). Leptin and Adiponectin Modulate the Self-renewal of Normal Human Breast Epithelial Stem Cells. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 8, 1174–1183.

#### -F-

Falender, A.E., Freiman, R.N., Geles, K.G., Lo, K.C., Hwang, K., Lamb, D.J., Morris, P.L., Tjian, R., and Richards, J.S. (2005). Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev.* 19, 794–803.

Fan, L., Moon, J., Wong, T.-T., Crodian, J., and Collodi, P. (2008). Zebrafish primordial germ cell cultures derived from vasa::RFP transgenic embryos. *Stem Cells Dev.* 17, 585–597.

Farmer, S.R. (2003). The forkhead transcription factor Foxo1: a possible link between obesity and insulin resistance. *Mol. Cell* 11, 6–8.

Fasano, S., Goos, H.J., Janssen, C., and Pierantoni, R. (1993). Two GnRHs fluctuate in correlation with androgen levels in the male frog *Rana esculenta*. *J. Exp. Zool.* 266, 277–283.

Feng, L.X., Ravindranath, N., and Dym, M. (2000). Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J. Biol. Chem.* 275, 25572–25576.

Feng, R., Fang, L., Cheng, Y., He, X., Jiang, W., Dong, R., Shi, H., Jiang, D., Sun, L., and Wang, D. (2015). Retinoic acid homeostasis through *aldh1a2* and *cyp26a1* mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Rep.* 5, 10131.

Feng, W., Chen, S., Do, D., Liu, Q., Deng, Y., Lei, X., Luo, C., Huang, B., and Shi, D. (2016). Isolation and Identification of Prepubertal Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatogonial Stem Cells. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 29, 1407–1415.

Fenske, M., and Segner, H. (2004). Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 67, 105–126.

Fernández, J.A., Bubner, E.J., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Wang, T., Cummins, S.F., and Elizur, A. (2015). Primordial germ cell migration in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and identification of stromal cell-derived factor 1. *Gen. Comp. Endocrinol.* *213*, 16–23.

Filipponi, D., Hobbs, R.M., Ottolenghi, S., Rossi, P., Jannini, E.A., Pandolfi, P.P., and Dolci, S. (2007). Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 6770–6781.

Fleck, D., Mundt, N., Bruentgens, F., Geilenkirchen, P., Machado, P.A., Veitinger, T., Veitinger, S., Lipartowski, S.M., Engelhardt, C.H., Oldiges, M., et al. (2016). Distinct purinergic signaling pathways in prepubescent mouse spermatogonia. *J. Gen. Physiol.* *148*, 253–271.

Fontagné-Dicharry, S., Lataillade, E., Surget, A., Brèque, J., Zambonino-Infante, J.-L., and Kaushik, S.J. (2010). Effects of dietary vitamin A on broodstock performance, egg quality, early growth and retinoid nuclear receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*.

Forrest, K.M., and Gavis, E.R. (2003). Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* *13*, 1159–1168.

França, L.R., Nóbrega, R.H., Morais, R.D.V.S., De Castro Assis, L.H., and Schulz, R.W. (2015). 13 - Sertoli cell structure and function in anamniote vertebrates A2 - Griswold, Michael D. In *Sertoli Cell Biology* (Second Edition), (Oxford: Academic Press), pp. 385–407.

França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C., and Griswold, M.D. (2016). The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* *4*, 189–212.

Franke, W.W., Grund, C., and Schmid, E. (1979). Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *Eur. J. Cell Biol.* *19*, 269–275.

Freiman, R.N., Albright, S.R., Zheng, S., Sha, W.C., Hammer, R.E., and Tjian, R. (2001). Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science* *293*, 2084–2087.

Froschauer, A., Khatun, M.M., Sprott, D., Franz, A., Rieger, C., Pfennig, F., and Gutzeit, H.O. (2013). oct4-EGFP reporter gene expression marks the stem cells in embryonic development and in adult gonads of transgenic medaka. *Mol. Reprod. Dev.* *80*, 48–58.

## -G-

Gallardo, T., Shirley, L., John, G.B., and Castrillon, D.H. (2007). Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre. *Genes. N. Y. N* *2000* *45*, 413–417.

Gamo, H. (1961). On the origin of germ cells and formation of gonad primordia in the medaka, *Oryzias latipes*. *Jpn. J. Zool.* *13*,

García-López, A., Bogerd, J., Granneman, J.C.M., van Dijk, W., Trant, J.M., Taranger, G.L., and Schulz, R.W. (2009). Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology* *150*, 357–365.

Gautier, A., Sohm, F., Joly, J.-S., Gac, F.L., and Lareyre, J.-J. (2011a). The Proximal Promoter Region of the Zebrafish *gsdf* Gene Is Sufficient to Mimic the Spatio-Temporal Expression Pattern of the Endogenous Gene in Sertoli and Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* *85*, 1240–1251.

Gautier, A., Le Gac, F., and Lareyre, J.-J. (2011b). The *gsdf* gene locus harbors evolutionary conserved and clustered genes preferentially expressed in fish previtellogenic oocytes. *Gene* *472*, 7–17.

Gautier, A., Goupil, A.-S., Le Gac, F., and Lareyre, J.-J. (2013). A promoter fragment of the *sycp1* gene is sufficient to drive transgene expression in male and female meiotic germ cells in zebrafish. *Biol. Reprod.* *89*, 89.

Gautier, A., Bosseboeuf, A., Auvray, P., and Sourdain, P. (2014). Maintenance of potential spermatogonial stem cells in vitro by GDNF treatment in a chondrichthyan model (*Scyliorhinus canicula* L.). *Biol. Reprod.* *91*, 91.

Gely-Pernot, A., Raverdeau, M., Célébi, C., Dennefeld, C., Feret, B., Klopfenstein, M., Yoshida, S., Ghyselinck, N.B., and Mark, M. (2012). Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor  $\gamma$ . *Endocrinology* *153*, 438–449.

Gely-Pernot, A., Raverdeau, M., Teletin, M., Vernet, N., Féret, B., Klopfenstein, M., Dennefeld, C., Davidson, I., Benoit, G., Mark, M., et al. (2015). Retinoic Acid Receptors Control Spermatogonia Cell-Fate and Induce Expression of the SALL4A Transcription Factor. *PLoS Genet.* *11*, e1005501.

Ghyselinck, N.B., Vernet, N., Dennefeld, C., Giese, N., Nau, H., Chambon, P., Viville, S., and Mark, M. (2006). Retinoids and spermatogenesis: lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *235*, 1608–1622.

Ginsburg, M., Snow, M.H., and McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* *110*, 521–528.

Goertz, M.J., Wu, Z., Gallardo, T.D., Hamra, F.K., and Castrillon, D.H. (2011). Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *J. Clin. Invest.* *121*, 3456–3466.

Golestaneh, N., Beauchamp, E., Fallen, S., Kokkinaki, M., Uren, A., and Dym, M. (2009). Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells. *Reprod. Camb. Engl.* *138*, 151–162.

Golumbeski, G.S., Bardsley, A., Tax, F., and Boswell, R.E. (1991). tudor, a posterior-group gene of *Drosophila melanogaster*, encodes a novel protein and an mRNA localized during mid-oogenesis. *Genes Dev.* *5*, 2060–2070.

Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., and Le Gac, F. (1999). Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* *113*, 413–428.

Gönczy, P., Matunis, E., and DiNardo, S. (1997). bag-of-marbles and benign gonial cell neoplasm act in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 4361–4371.

Grier, H.J., and Linton, J.R. (1977). Ultrastructural identification of the Sertoli cell in the testis of the northern pike, *Esox lucius*. *Am. J. Anat.* *149*, 283–288.

Grier, H.J., Fitzsimons, J.M., and Linton, J.R. (1978). Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in goodeid teleosts. *J. Morphol.* *156*, 419–437.

Grier, H.J., Uribe, M., Parenti, L.R., and De la Rose-Cruz, G. (2005). Fecundity, the Germinal Epithelium, and Folliculogenesis in Viviparous Fishes.

Groh, K.J., Schönenberger, R., Eggen, R.I.L., Segner, H., and Suter, M.J.-F. (2013). Analysis of protein expression in zebrafish during gonad differentiation by targeted proteomics. *Gen. Comp. Endocrinol.* *193*, 210–220.

Gu, Y., Runyan, C., Shoemaker, A., Surani, A., and Wylie, C. (2009). Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 1295–1303.

Guraya, S.S. (1995a). The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. *Int. Rev. Cytol.* *160*, 163–220.

Guraya, S.S. (1995b). The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. *Int. Rev. Cytol.* *160*, 163–220.

Guttenbach, M., Martínez-Expósito, M.J., Engel, W., and Schmid, M. (1996). Interphase chromosome arrangement in Sertoli cells of adult mice. *Biol. Reprod.* *54*, 980–986.

## -H-

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* *41*, 95–98.

Hamaguchi, S. (1982). A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res.* *227*, 139–151.

- Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R., and Höög, C. (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J. Cell Sci.* *119*, 4025–4032.
- Hamra, F.K., Schultz, N., Chapman, K.M., Grellhesl, D.M., Cronkhite, J.T., Hammer, R.E., and Garbers, D.L. (2004). Defining the spermatogonial stem cell. *Dev. Biol.* *269*, 393–410.
- Han, J.K., and Martin, G.R. (1993). Embryonic expression of Fgf-6 is restricted to the skeletal muscle lineage. *Dev. Biol.* *158*, 549–554.
- Hanyu-Nakamura, K., Kobayashi, S., and Nakamura, A. (2004). Germ cell-autonomous Wunen2 is required for germline development in *Drosophila* embryos. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 4545–4553.
- Hanyu-Nakamura, K., Sonobe-Nojima, H., Tanigawa, A., Lasko, P., and Nakamura, A. (2008). *Drosophila* Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells. *Nature* *451*, 730–733.
- Hao, J., Yamamoto, M., Richardson, T.E., Chapman, K.M., Denard, B.S., Hammer, R.E., Zhao, G.Q., and Hamra, F.K. (2008). Sohlh2 knockout mice are male-sterile because of degeneration of differentiating type A spermatogonia. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 1587–1597.
- Hara, K., Nakagawa, T., Enomoto, H., Suzuki, M., Yamamoto, M., Simons, B.D., and Yoshida, S. (2014). Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell* *14*, 658–672.
- Harris, A.N., and Macdonald, P.M. (2001). Aubergine encodes a *Drosophila* polar granule component required for pole cell formation and related to eIF2C. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 2823–2832.
- Hasegawa, K., and Saga, Y. (2014). FGF8-FGFR1 Signaling Acts as a Niche Factor for Maintaining Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse. *Biol. Reprod.* *91*, 145.
- Hatef, A., Alavi, S.M.H., Rodina, M., and Linhart, O. (2012). Morphology and fine structure of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseridae, Chondrostei) spermatozoa. *J. Appl. Ichthyol.* *28*, 978–983.
- Hayashi, M., Sato, M., Nagasaka, Y., Sadaie, S., Kobayashi, S., and Yoshizaki, G. (2014). Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost. *Biol. Reprod.* *91*, 23.
- Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., and Schartl, M. (2007). Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev. Biol.* *7*, 3.
- Hibi, H., Yokoi, K., and Yamamoto, M. (1997). Effects of alpha-interferon on sperm production, concentration, and motility in the rat. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* *4*, 603–607.
- Hinfray, N., Nóbrega, R.H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Maréchal, E., Chadili, E., Palluel, O., Porcher, J.-M., Schulz, R., and Brion, F. (2013). Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *J. Endocrinol.* *216*, 375–388.
- Hisaoka, K.K., and Firlit, C.F. (1962). Ovarian Cycle and Egg Production in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Copeia* *1962*, 788–792.
- Hogarth, C.A., and Griswold, M.D. (2013). Retinoic acid regulation of male meiosis. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* *20*, 217–223.
- Hogarth, C.A., Evanoff, R., Snyder, E., Kent, T., Mitchell, D., Small, C., Amory, J.K., and Griswold, M.D. (2011). Suppression of Stra8 expression in the mouse gonad by WIN 18,446. *Biol. Reprod.* *84*, 957–965.
- Houwing, S., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2008). Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J.* *27*, 2702–2711.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* *496*, 498–503.
- Huang, K., and Lui, W.-Y. (2016). Nectins and nectin-like molecules (Necls): Recent findings and their role and regulation in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*



Huang, X., Zhao, Y., Liu, L., Fan, Z., Zhou, L., Wang, Z., Wei, L., Wang, D., and Wei, J. (2016). Characterization of the POU5F1 homologue in Nile tilapia: from expression pattern to biological activity. *Stem Cells Dev.*

Huckins, C., and Oakberg, E.F. (1978). Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes. *Anat. Rec.* 192, 519–528.

Hulspas, R., and Quesenberry, P.J. (2000). Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry* 40, 245–250.

Hume, D.A., Halpin, D., Charlton, H., and Gordon, S. (1984). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4174–4177.

#### -I-

Iida, T., and Kobayashi, S. (1998). Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11274–11278.

Ikenishi, K. (1998). Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev. Growth Differ.* 40, 1–10.

Illmensee, K., and Mahowald, A.P. (1976). The autonomous function of germ plasm in a somatic region of the *Drosophila* egg. *Exp. Cell Res.* 97, 127–140.

Inaba, M., Yamashita, Y.M., and Buszczak, M. (2016). Keeping stem cells under control: New insights into the mechanisms that limit niche-stem cell signaling within the reproductive system. *Mol. Reprod. Dev.* n/a-n/a.

Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2012). FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of *Etv5* and *Bcl6b* through MAP2K1 activation. *Development* 139, 1734–1743.

Issigonis, M., Tulina, N., de Cuevas, M., Brawley, C., Sandler, L., and Matunis, E. (2009). JAK-STAT signal inhibition regulates competition in the *Drosophila* testis stem cell niche. *Science* 326, 153–156.

Iwamatsu, T., Yoshizaki, N., and Shibata, Y. (1997). Changes in the chorion and sperm entry into the micropyle during fertilization in the teleostean fish, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 39, 33–41.

#### -J-

Jackson, K.A., Mi, T., and Goodell, M.A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14482–14486.

Jafarian, A., Sadeghi, M.R., Pejhan, N., Salehkhoo, S., Lakpour, N., and Akhondi, M.M. (2014). Regeneration of spermatogenesis in a mouse model of azoospermia by follicle-stimulating hormone and oestradiol. *Andrologia* 46, 1098–1106.

Jamieson, B.G.M., and Leung, L.K.-P. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa: With a Survey of Lophophorate, Echinoderm and Protochordate Sperm and an Account of Gamete Cryopreservation* (Cambridge University Press).

Jiang, D.-N., Yang, H.-H., Li, M.-H., Shi, H.-J., Zhang, X.-B., and Wang, D.-S. (2016). *gsdf* is a downstream gene of *dmrt1* that functions in the male sex determination pathway of the Nile tilapia. *Mol. Reprod. Dev.* 83, 497–508.

Johnston, P.M. (1951). The embryonic history of the germ cells of the largemouth black bass, *Micropterus salmoides salmoides* (Lacépède). *J. Morphol.* 88, 471–542.

Johnstone, O., and Lasko, P. (2001). Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu. Rev. Genet.* 35, 365–406.

Jones, J., and Macdonald, P.M. (2015). *Neur14* contributes to germ cell formation and integrity in *Drosophila*. *Biol. Open* 4, 937–946.

Jongens, T.A., Ackerman, L.D., Swedlow, J.R., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Germ cell-less encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. *Genes Dev.* 8, 2123–2136.

## -K-

Kaebisch, C., Schipper, D., Babczyk, P., and Tobiasch, E. (2015). The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 75–84.

Kagawa, H., Gen, K., Okuzawa, K., and Tanaka, H. (2003). Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biol. Reprod.* 68, 1562–1568.

Kamachi, Y., and Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 140, 4129–4144.

Kanatsu-Shinohara, M., and Shinohara, T. (2013). Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 163–187.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69, 612–616.

Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Yoshida, S., Toyokuni, S., Lee, J., Ogura, A., and Shinohara, T. (2007). Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. *Biol. Reprod.* 76, 55–62.

Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., and Shinohara, T. (2012). Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by melanoma cell adhesion molecule expression. *Biol. Reprod.* 87, 139.

Kaucher, A.V., and Oatley, J.M. (2009). Neurogenin3 Is a Regulator of Mouse Spermatogonial Stem Cell Differentiation. *Biol. Reprod.* 81, 146–146.

Kaucher, A.V., Oatley, M.J., and Oatley, J.M. (2012). NEUROG3 is a critical downstream effector for STAT3-regulated differentiation of mammalian stem and progenitor spermatogonia. *Biol. Reprod.* 86, 164, 1–11.

Kawase, E., Yamamoto, H., Hashimoto, K., and Nakatsuji, N. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Dev. Biol.* 161, 91–95.

Kawase, E., Wong, M.D., Ding, B.C., and Xie, T. (2004). Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the *Drosophila* testis. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1365–1375.

Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J.M., Adachi, S., and Yamauchi, K. (2008). Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biol. Reprod.* 79, 938–946.

Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A.F., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., et al. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131, 1273–1286.

Keeney, S., Giroux, C.N., and Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375–384.

Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomelí, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Schöler, H.R., et al. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* 5, 1078–1083.

Kiger, A.A., Jones, D.L., Schulz, C., Rogers, M.B., and Fuller, M.T. (2001). Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* 294, 2542–2545.

Kim, D., and Salzberg, S.L. (2011). TopHat-Fusion: an algorithm for discovery of novel fusion transcripts. *Genome Biol.* 12, R72.

- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36.
- Kimble, J.E., and White, J.G. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **81**, 208–219.
- Kise, K., Yoshikawa, H., Sato, M., Tashiro, M., Yazawa, R., Nagasaka, Y., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2012). Flow-cytometric isolation and enrichment of teleost type A spermatogonia based on light-scattering properties. *Biol. Reprod.* **86**, 107.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., Nüsslein-Volhard, C., and Tübingen 2000 Screen Consortium (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature* **421**, 279–282.
- Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M., and Kitamura, T. (1996). Essential role of the posterior morphogen *nanos* for germline development in *Drosophila*. *Nature* **380**, 708–711.
- Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N., and Nagahama, Y. (2004). Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.* **231**, 518–526.
- Kohlhase, J., Heinrich, M., Liebers, M., Fröhlich Archangelo, L., Reardon, W., and Kispert, A. (2002). Cloning and expression analysis of *SALL4*, the murine homologue of the gene mutated in Okhiro syndrome. *Cytogenet. Genome Res.* **98**, 274–277.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2001). A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* **15**, 2877–2885.
- Kostereva, N., and Hofmann, M.-C. (2008). Regulation of the Spermatogonial Stem Cell Niche. *Reprod. Domest. Anim. Zuchtig.* **43**, 386–392.
- Koulish, S., Kramer, C.R., and Grier, H.J. (2002). Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J. Morphol.* **254**, 292–311.
- Krøvel, A.V., and Olsen, L.C. (2002). Expression of a *vas::EGFP* transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech. Dev.* **116**, 141–150.
- Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2003). Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 6487–6492.
- Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2004). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* **71**, 722–731.
- Kubota, H., Wu, X., Goodyear, S.M., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **25**, 2604–2614.
- Kunwar, P.S., Starz-Gaiano, M., Bainton, R.J., Heberlein, U., and Lehmann, R. (2003). *Tre1*, a G protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of *Drosophila* germ cells. *PLoS Biol.* **1**, E80.
- Kunwar, P.S., Siekhaus, D.E., and Lehmann, R. (2006). In vivo migration: a germ cell perspective. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 237–265.
- Kunwar, P.S., Sano, H., Renault, A.D., Barbosa, V., Fuse, N., and Lehmann, R. (2008). *Tre1* GPCR initiates germ cell transepithelial migration by regulating *Drosophila melanogaster* E-cadherin. *J. Cell Biol.* **183**, 157–168.
- Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K., and Saitou, M. (2008). Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by *Blimp1* for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev.* **22**, 1617–1635.
- Kurokawa, H., Aoki, Y., Nakamura, S., Ebe, Y., Kobayashi, D., and Tanaka, M. (2006). Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* **48**, 209–221.

Kushida, T., Iijima, H., Nagato, Y., and Kushida, H. (1993). Studies on thick sections of the nucleus of mouse Sertoli cells using an electron microscope operating at 300 kV. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 70, 41–50.

Kwan, K.M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B.D., Hardy, M.E., Campbell, D.S., Parant, J.M., Yost, H.J., Kanki, J.P., and Chien, C.-B. (2007). The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 3088–3099.

-L-

Lacerda, S.M. dos S.N., Costa, G.M.J., and de França, L.R. (2014). Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *Gen. Comp. Endocrinol.* 207, 56–65.

Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R., Costa, G.M.J., Segatelli, T.M., Quirino, B.R., Queiroz, B.M., Kalapothakis, E., and França, L.R. (2010). A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PLoS One* 5, e10740.

Lai, F., Singh, A., and King, M.L. (2012). *Xenopus* Nanos1 is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* 139, 1476–1486.

Laird, D.J., Altshuler-Keylin, S., Kissner, M.D., Zhou, X., and Anderson, K.V. (2011). Ror2 enhances polarity and directional migration of primordial germ cells. *PLoS Genet.* 7, e1002428.

Lammers, J.H., Offenberg, H.H., van Aalderen, M., Vink, A.C., Dietrich, A.J., and Heyting, C. (1994). The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1137–1146.

Lange, U.C., Adams, D.J., Lee, C., Barton, S., Schneider, R., Bradley, A., and Surani, M.A. (2008). Normal germ line establishment in mice carrying a deletion of the *Irfm/Fragilis* gene family cluster. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4688–4696.

Laronda, M.M., and Jameson, J.L. (2011). Sox3 functions in a cell-autonomous manner to regulate spermatogonial differentiation in mice. *Endocrinology* 152, 1606–1615.

Lasko, P.F., and Ashburner, M. (1988). The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335, 611–617.

Lassalle, B., Bastos, H., Louis, J.P., Riou, L., Testart, J., Dutrillaux, B., Fouchet, P., and Allemand, I. (2004). 'Side Population' cells in adult mouse testis express *Bcrp1* gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* 131, 479–487.

Laws, K.M., Sampson, L.L., and Drummond-Barbosa, D. (2015). Insulin-independent role of adiponectin receptor signaling in *Drosophila* germline stem cell maintenance. *Dev. Biol.* 399, 226–236.

Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., and Hogan, B.L. (1999). *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13, 424–436.

Le Gac, F., Loir, M., le Bail, P.Y., and Ollitrault, M. (1996). Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 23–35.

Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., and Schulz, R.W. (2009a). Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol. Reprod.* 81, 177–187.

Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., and Schulz, R.W. (2009b). Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. *Biol. Reprod.* 81, 177–187.

Leatherman, J.L., and Dinardo, S. (2010). Germline self-renewal requires cyst stem cells and stat regulates niche adhesion in *Drosophila* testes. *Nat. Cell Biol.* 12, 806–811.

Leatherman, J.L., Levin, L., Boero, J., and Jongens, T.A. (2002). *germ cell-less* acts to repress transcription during the establishment of the *Drosophila* germ cell lineage. *Curr. Biol. CB* 12, 1681–1685.

- Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Kimura, T., Nakano, T., Ogura, A., and Shinohara, T. (2007). Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 1853–1859.
- Lee, W., Mason, A.J., Schwall, R., Szonyi, E., and Mather, J.P. (1989). Secretion of activin by interstitial cells in the testis. *Science* *243*, 396–398.
- Lee, W.-Y., Do, J.T., Park, C., Kim, J.H., Chung, H.-J., Kim, K.-W., Gil, C.-H., Kim, N.-H., and Song, H. (2016). Identification of Putative Biomarkers for the Early Stage of Porcine Spermatogonial Stem Cells Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* *11*, e0147298.
- Legault, R. (1958). A technique for controlling the time of daily spawning and collecting of eggs of the zebra fish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Copeia* *1958*, 328–330.
- Lehmann, R., and Ephrussi, A. (1994). Germ plasm formation and germ cell determination in *Drosophila*. *Ciba Found. Symp.* *182*, 282-296-300.
- Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 605–631.
- Li, H., Papadopoulos, V., Vidic, B., Dym, M., and Culty, M. (1997). Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology* *138*, 1289–1298.
- Li, H., MacLean, G., Cameron, D., Clagett-Dame, M., and Petkovich, M. (2009a). Cyp26b1 expression in murine Sertoli cells is required to maintain male germ cells in an undifferentiated state during embryogenesis. *PLoS One* *4*, e7501.
- Li, J., Xia, F., and Li, W.X. (2003). Coactivation of STAT and Ras is required for germ cell proliferation and invasive migration in *Drosophila*. *Dev. Cell* *5*, 787–798.
- Li, M., Hong, N., Xu, H., Yi, M., Li, C., Gui, J., and Hong, Y. (2009b). Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. *Mech. Dev.* *126*, 366–381.
- Li, M., Wu, F., Gu, Y., Wang, T., Wang, H., Yang, S., Sun, Y., Zhou, L., Huang, X., Jiao, B., et al. (2012a). Insulin-Like Growth Factor 3 Regulates Expression of Genes Encoding Steroidogenic Enzymes and Key Transcription Factors in the Nile Tilapia Gonad. *Biol. Reprod.* *86*, 163.
- Li, M., Hong, N., Gui, J., and Hong, Y. (2012b). Medaka piwi is essential for primordial germ cell migration. *Curr. Mol. Med.* *12*, 1040–1049.
- Li, M., Zhu, F., Li, Z., Hong, N., and Hong, Y. (2016). Dazl is a critical player for primordial germ cell formation in medaka. *Sci. Rep.* *6*, 28317.
- Li, W., Deng, F., Wang, H., Zhen, Y., Xiang, F., Sui, Y., and Li, J. (2006). Germ cell-less expression in zebrafish embryos. *Dev. Growth Differ.* *48*, 333–338.
- Li, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Sun, J., and Hao, J. (2014). BMP4/Smad signaling pathway induces the differentiation of mouse spermatogonial stem cells via upregulation of Sohlh2. *Anat. Rec. Hoboken NJ* *297*, 749–757.
- Liang, Q., Xu, C., Chen, X., Li, X., Lu, C., Zhou, P., Yin, L., Qian, R., Chen, S., Ling, Z., et al. (2015). The roles of Mesp family proteins: functional diversity and redundancy in differentiation of pluripotent stem cells and mammalian mesodermal development. *Protein Cell* *6*, 553–561.
- Liew, W.C., and Orbán, L. (2014). Zebrafish sex: a complicated affair. *Brief. Funct. Genomics* *13*, 172–187.
- Liew, W.C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K.R., and Orban, L. (2012). Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. *PLOS ONE* *7*, e34397.
- Lim, C.Y., Tam, W.-L., Zhang, J., Ang, H.S., Jia, H., Lipovich, L., Ng, H.-H., Wei, C.-L., Sung, W.K., Robson, P., et al. (2008). Sall4 regulates distinct transcription circuitries in different blastocyst-derived stem cell lineages. *Cell Stem Cell* *3*, 543–554.

Ling, L., Maguire, J.J., and Davenport, A.P. (2013). Endothelin-2, the forgotten isoform: emerging role in the cardiovascular system, ovarian development, immunology and cancer. *Br. J. Pharmacol.* 168, 283–295.

Liu, G., Luo, F., Song, Q., Wu, L., Qiu, Y., Shi, H., Wang, D., and Zhou, L. (2014). Blocking of progestin action disrupts spermatogenesis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Mol. Endocrinol.* 53, 57–70.

Liu, L., Hong, N., Xu, H., Li, M., Yan, Y., Purwanti, Y., Yi, M., Li, Z., Wang, L., and Hong, Y. (2009). Medaka dead end encodes a cytoplasmic protein and identifies embryonic and adult germ cells. *Gene Expr. Patterns GEP* 9, 541–548.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408.

Loir, M. (1994). In vitro approach to the control of spermatogonia proliferation in the trout. *Mol. Cell. Endocrinol.* 102, 141–150.

Loir, M. (1999a). Spermatogonia of rainbow trout: I. Morphological characterization, mitotic activity, and survival in primary cultures of testicular cells. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 422–433.

Loir, M. (1999b). Spermatogonia of rainbow trout: III. In vitro study of the proliferative response to extracellular ATP and adenosine. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 443–450.

Loir, M. (2001). Adenosine receptor-adenylate cyclase system in the trout testis: involvement in the regulation of germ cell proliferation. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 307–317.

Loir, M., and Le Gac, F. (1994). Insulin-like growth factor-I and -II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogonia and spermatocytes. *Biol. Reprod.* 51, 1154–1163.

Lolicato, F., Marino, R., Paronetto, M.P., Pellegrini, M., Dolci, S., Geremia, R., and Grimaldi, P. (2008). Potential role of Nanos3 in maintaining the undifferentiated spermatogonia population. *Dev. Biol.* 313, 725–738.

Loppion, G., Crespel, A., Martinez, A.-S., Auvray, P., and Sourdain, P. (2008). Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus canicula* L. *Cell Tissue Res.* 332, 533–542.

Lovasco, L.A., Gustafson, E.A., Seymour, K.A., de Rooij, D.G., and Freiman, R.N. (2015). TAF4b is required for mouse spermatogonial stem cell development. *Stem Cells Dayt. Ohio* 33, 1267–1276.

Lucas, T.F., Nascimento, A.R., Pisolato, R., Pimenta, M.T., Lazari, M.F.M., and Porto, C.S. (2014). Receptors and signaling pathways involved in proliferation and differentiation of Sertoli cells. *Spermatogenesis* 4, e28138.

Luzio, A., Matos, M., Santos, D., Fontainhas-Fernandes, A.A., Monteiro, S.M., and Coimbra, A.M. (2016). Disruption of apoptosis pathways involved in zebrafish gonad differentiation by  $17\alpha$ -ethinylestradiol and fadrozole exposures. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 177, 269–284.

## -M-

Maegawa, S., Yasuda, K., and Inoue, K. (1999). Maternal mRNA localization of zebrafish DAZ-like gene. *Mech. Dev.* 81, 223–226.

Maegawa, S., Yamashita, M., Yasuda, K., and Inoue, K. (2002). Zebrafish DAZ-like protein controls translation via the sequence “GUUC.” *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 7, 971–984.

Magalhães, A.L.B., Andrade, R.F., Gomes, B.V.C., Perini, V.R., Rizzo, E., and Bazzoli, N. (2011). Ultrastructure of the semicyclic spermatogenesis in the South American freshwater characid *Hemigrammus marginatus* (Teleostei, Characiformes). *J. Appl. Ichthyol.* 27, 1041–1046.

Majhi, S.K., Hattori, R.S., Yokota, M., Watanabe, S., and Strüssmann, C.A. (2009). Germ Cell Transplantation Using Sexually Competent Fish: An Approach for Rapid Propagation of Endangered and Valuable Germlines. *PLOS ONE* 4, e6132.

Mak, P., and Callard, G.V. (1987). A novel steroid-binding protein in the testis of the dogfish *Squalus acanthias*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 104–112.

Markovich, M.L., Rizzuto, N.V., and Brown, P.B. (2007). Diet affects spawning in zebrafish. *Zebrafish* 4, 69–74.

- Martinho, R.G., Kunwar, P.S., Casanova, J., and Lehmann, R. (2004). A noncoding RNA is required for the repression of RNApolIII-dependent transcription in primordial germ cells. *Curr. Biol. CB* 14, 159–165.
- Mather, J.P., Attie, K.M., Woodruff, T.K., Rice, G.C., and Phillips, D.M. (1990). Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis. *Endocrinology* 127, 3206–3214.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., et al. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563.
- Matthews, J.L. (2004). Common diseases of laboratory zebrafish. *Methods Cell Biol.* 77, 617–643.
- Matunis, E.L., Stine, R.R., and Cuevas, M. de (2012). Recent advances in *Drosophila* male germline stem cell biology. *Spermatogenesis* 2, 137–144.
- Mazerbourg, S., Sangkuhl, K., Luo, C.-W., Sudo, S., Klein, C., and Hsueh, A.J.W. (2005). Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *J. Biol. Chem.* 280, 32122–32132.
- Mazurais, D., Montfort, J., Delalande, C., and Le Gac, F. (2005). Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 143–154.
- McCoshen, J.A., and McCallion, D.J. (1975). A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice. *Experientia* 31, 589–590.
- McKearin, D.M., and Spradling, A.C. (1990). bag-of-marbles: a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis. *Genes Dev.* 4, 2242–2251.
- McLaren, A. (1992). Development of primordial germ cells in the mouse\*. *Andrologia* 24, 243–247.
- McLaughlin, E.A., Gunter, K., Woollett, K., and Roman, S.D. (2008). Chemokines: Role in Germ Cell Migration and Survival. *Biol. Reprod.* 78, 53–53.
- Meehan, T., Schlatt, S., O'Bryan, M.K., de Kretser, D.M., and Loveland, K.L. (2000). Regulation of Germ Cell and Sertoli Cell Development by Activin, Follistatin, and FSH. *Dev. Biol.* 220, 225–237.
- Megosh, H.B., Cox, D.N., Campbell, C., and Lin, H. (2006). The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr. Biol. CB* 16, 1884–1894.
- Mei, X.-X., Wang, J., and Wu, J. (2015). Extrinsic and intrinsic factors controlling spermatogonial stem cell self-renewal and differentiation. *Asian J. Androl.* 17, 347–354.
- Meinelt, B.T., Schulz, C., Wirth, M., Kürzinger, H., and Steinberg, C. (1999). Dietary fatty acid composition influences the fertilization rate of zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan). *J. Appl. Ichthyol.* 15, 19–23.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., et al. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287, 1489–1493.
- Meuwissen, R.L., Offenberg, H.H., Dietrich, A.J., Riesewijk, A., van Iersel, M., and Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 11, 5091–5100.
- Miettinen, M., Virtanen, I., and Talerman, A. (1985). Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *Am. J. Pathol.* 120, 402–410.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631–642.
- Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., and Nagahama, Y. (1995). Human Recombinant Activin Induces Proliferation of Spermatogonia *in vitro* in the Japanese Eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 61, 434–437.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T., and Yamauchi, K. (1999). Estradiol-17beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 230–234.

- Miura, T., Miura, C., Konda, Y., and Yamauchi, K. (2002). Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2689–2697.
- Miura, T., Ohta, T., Miura, C.I., and Yamauchi, K. (2003). Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144, 5504–5510.
- Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T., and Miura, C. (2006). Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7333–7338.
- Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., and Wylie, C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev. Biol.* 240, 488–498.
- Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., et al. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Dev. Camb. Engl.* 130, 4279–4286.
- Morais, R.D.V.S., Nóbrega, R.H., Gómez-González, N.E., Schmidt, R., Bogerd, J., França, L.R., and Schulz, R.W. (2013a). Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Endocrinology* 154, 4365–4376.
- Morais, R.D.V.S., Nóbrega, R.H., Gómez-González, N.E., Schmidt, R., Bogerd, J., França, L.R., and Schulz, R.W. (2013b). Thyroid Hormone Stimulates the Proliferation of Sertoli Cells and Single Type A Spermatogonia in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Testis. *Endocrinology* 154, 4365–4376.
- Morimoto, H., Iwata, K., Ogonuki, N., Inoue, K., Atsuo, O., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, T., Yabe-Nishimura, C., and Shinohara, T. (2013). ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 12, 774–786.
- Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., and Shinohara, T. (2015). ROS-Generating Oxidase Nox3 Regulates the Self-Renewal of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Biol. Reprod.* 92, 147.
- Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., and Kondoh, H. (2007). The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9691–9696.
- Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598–611.
- Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2004). Cell-cell interactions at the ectoplasmic specialization in the testis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 15, 439–447.
- Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2010). Tight junctions in the testis: new perspectives. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1621–1635.
- Muffato, M., Louis, A., Poisnel, C.-E., and Roest Crollius, H. (2010). Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 1119–1121.
- Mullaney, B.P., and Skinner, M.K. (1992). Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology* 131, 2928–2934.
- Murphy, K., Carvajal, L., Medico, L., and Pepling, M. (2005). Expression of Stat3 in germ cells of developing and adult mouse ovaries and testes. *Gene Expr. Patterns GEP* 5, 475–482.
- Murphy, M.W., Sarver, A.L., Rice, D., Hatzi, K., Ye, K., Melnick, A., Heckert, L.L., Zarkower, D., and Bardwell, V.J. (2010). Genome-wide analysis of DNA binding and transcriptional regulation by the mammalian Doublesex homolog DMRT1 in the juvenile testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13360–13365.
- Murtha, M.T., Leckman, J.F., and Ruddle, F.H. (1991). Detection of homeobox genes in development and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10711–10715.
- Nader, M.R., Miura, T., Ando, N., Miura, C., and Yamauchi, K. (1999). Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biol. Reprod.* 61, 944–947.



-N-

- Nagano, M., and Brinster, R.L. (1998). Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 106, 47-55-57.
- Nagano, M.C., and Yeh, J.R. (2013). The identity and fate decision control of spermatogonial stem cells: where is the point of no return? *Curr. Top. Dev. Biol.* 102, 61–95.
- Nagano, M., Ryu, B.-Y., Brinster, C.J., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2003). Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod.* 68, 2207–2214.
- Nakagawa, T., Nabeshima, Y.-I., and Yoshida, S. (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev. Cell* 12, 195–206.
- Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R.E., and Yoshida, S. (2010). Functional Hierarchy and Reversibility within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. *Science* 328, 62–67.
- Nakajima, S., Hayashi, M., Kouguchi, T., Yamaguchi, K., Miwa, M., and Yoshizaki, G. (2014). Expression patterns of *gdnf* and *gfra1* in rainbow trout testis. *Gene Expr. Patterns GEP* 14, 111–120.
- Nakamura, A., Amikura, R., Mukai, M., Kobayashi, S., and Lasko, P.F. (1996). Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science* 274, 2075–2079.
- Nedelea, M., and Steopoe, I. (1970). [Origin, cytologic characteristics and behavior of primary gonocytes during embryogenesis in the young larvae of *Cyprinus carpio* L. (Teleosteans)]. *Anat. Anz.* 127, 338–346.
- Neumann, J.C., Chandler, G.L., Damoulis, V.A., Fustino, N.J., Lillard, K., Looijenga, L., Margraf, L., Rakheja, D., and Amatruda, J.F. (2011). Mutation in the type IB bone morphogenetic protein receptor *Alk6b* impairs germ-cell differentiation and causes germ-cell tumors in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13153–13158.
- Neumüller, R.A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K., Cohen, S.M., and Knoblich, J.A. (2008). *Mei-P26* regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature* 454, 241–245.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor *Oct4*. *Cell* 95, 379–391.
- Nieuwkoop, P.D., and Sutasurya, L.A. (1979). Primordial Germ Cells in the Chordates: Embryogenesis and Phylogenesis (CUP Archive).
- Niimi, A.J., and LaHam, Q.N. (1974). Influence of breeding time interval on egg number, mortality, and hatching of the zebra fish *Brachydanio rerio*. *Can. J. Zool.* 52, 515–517.
- Nishio, S.-I., Gibert, Y., Bernard, L., Brunet, F., Triqueneaux, G., and Laudet, V. (2008). Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 1682–1690.
- Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., and França, L.R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 197–206.
- Nóbrega, R.H., Greebe, C.D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L.R., and Schulz, R.W. (2010a). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One* 5.
- Nóbrega, R.H., Greebe, C.D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L.R., and Schulz, R.W. (2010b). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One* 5.
- Nóbrega, R.H., Morais, R.D.V. de S., Crespo, D., de Waal, P.P., de França, L.R., Schulz, R.W., and Bogerd, J. (2015). Fsh Stimulates Spermatogonial Proliferation and Differentiation in Zebrafish via *Igf3*. *Endocrinology* 156, 3804–3817.

-O-

- Oakberg, E.F. (1971). Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.* 169, 515–531.

- Oatley, J.M. (2010). Spermatogonial stem cell biology in the bull: development of isolation, culture, and transplantation methodologies and their potential impacts on cattle production. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 67, 133–143.
- Oatley, J.M., and Brinster, R.L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol. Rev.* 92, 577–595.
- Oatley, J.M., Avarbock, M.R., Talaranta, A.I., Fearon, D.T., and Brinster, R.L. (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9524–9529.
- Oatley, J.M., Oatley, M.J., Avarbock, M.R., Tobias, J.W., and Brinster, R.L. (2009). Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Dev. Camb. Engl.* 136, 1191–1199.
- Oatley, J.M., Kaucher, A.V., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2010). Regulation of mouse spermatogonial stem cell differentiation by STAT3 signaling. *Biol. Reprod.* 83, 427–433.
- Oatley, M.J., Racicot, K.E., and Oatley, J.M. (2011a). Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biol. Reprod.* 84, 639–645.
- Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Racicot, K.E., and Oatley, J.M. (2011b). Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biol. Reprod.* 85, 347–356.
- Ocón-Grove, O.M., Krzysik-Walker, S.M., Maddineni, S.R., Hendricks, G.L., and Ramachandran, R. (2008). Adiponectin and its receptors are expressed in the chicken testis: influence of sexual maturation on testicular ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA abundance. *Reprod. Camb. Engl.* 136, 627–638.
- O'Donovan, K.J., and Baraban, J.M. (1999). Major Egr3 isoforms are generated via alternate translation start sites and differ in their abilities to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4711–4718.
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., and Saitou, M. (2009). A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 137, 571–584.
- Ohta, T., and Iwamatsu, T. (1983). Electron microscopic observations on sperm entry into eggs of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*. *J. Exp. Zool.* 227, 109–119.
- Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K., and Nishimune, Y. (2000). Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2125–2131.
- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., and Miura, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol. Reprod.* 77, 970–977.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2006). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2725–2729.
- O'Leary, N.A., Wright, M.W., Brister, J.R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., et al. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D733-745.
- Olsen, L.C., Aasland, R., and Fjose, A. (1997). A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* 66, 95–105.
- Onoda, M., and Djakiew, D. (1990). Modulation of Sertoli cell secretory function by rat round spermatid protein(s). *Mol. Cell. Endocrinol.* 73, 35–44.
- Onoda, M., and Djakiew, D. (1991). Pachytene spermatocyte protein(s) stimulate Sertoli cells grown in bicameral chambers: dose-dependent secretion of ceruloplasmin, sulfated glycoprotein-1, sulfated glycoprotein-2, and transferrin. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* 27A, 215–222.
- Ozaki, Y., Higuchi, M., Miura, C., Yamaguchi, S., Tozawa, Y., and Miura, T. (2006). Roles of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Fish Spermatogenesis. *Endocrinology* 147, 5139–5146.

Ozaki, Y., Saito, K., Shinya, M., Kawasaki, T., and Sakai, N. (2011). Evaluation of Sycp3, Plzf and Cyclin B3 expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expr. Patterns GEP* 11, 309–315.

**-P-**

Page, S.L., McKim, K.S., Deneen, B., Van Hook, T.L., and Hawley, R.S. (2000). Genetic studies of mei-P26 reveal a link between the processes that control germ cell proliferation in both sexes and those that control meiotic exchange in *Drosophila*. *Genetics* 155, 1757–1772.

Papagiannouli, F., and Mechler, B.M. (2009). discs large regulates somatic cyst cell survival and expansion in *Drosophila* testis. *Cell Res.* 19, 1139–1149.

Papah, M.B., Kisia, S.M., Ojoo, R.O., Makanya, A.N., Wood, C.M., Kavembe, G.D., Maina, J.N., Johannsson, O.E., Bergman, H.L., Laurent, P., et al. (2013). Morphological evaluation of spermatogenesis in Lake Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*): a fish living on the edge. *Tissue Cell* 45, 371–382.

Paranko, J., Kallajoki, M., Pelliniemi, L.J., Lehto, V.P., and Virtanen, I. (1986). Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Dev. Biol.* 117, 35–44.

Parenti, L.R., and Grier, H.J. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.* 44, 333–348.

Park, T.I.-H., Monzo, H., Mee, E.W., Bergin, P.S., Teoh, H.H., Montgomery, J.M., Faull, R.L.M., Curtis, M.A., and Dragunow, M. (2012). Adult human brain neural progenitor cells (NPCs) and fibroblast-like cells have similar properties in vitro but only NPCs differentiate into neurons. *PLoS One* 7, e37742.

Parker, L., Stathakis, D.G., and Arora, K. (2004). Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 34, 73–101.

Pauli, A., Valen, E., Lin, M.F., Garber, M., Vastenhouw, N.L., Levin, J.Z., Fan, L., Sandelin, A., Rinn, J.L., Regev, A., et al. (2012). Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. *Genome Res.* 22, 577–591.

van Pelt, A.M., and de Rooij, D.G. (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology* 128, 697–704.

Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D.J., and Schöler, H. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* 71, 89–98.

Pfennig, F., Standke, A., and Gutzeit, H.O. (2015). The role of Amh signaling in teleost fish--Multiple functions not restricted to the gonads. *Gen. Comp. Endocrinol.* 223, 87–107.

Pitetti, J.-L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M.D., Aubry, F., Cederroth, C.R., Urner, F., Fumel, B., Crausaz, M., et al. (2013). An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 27, 814–827.

Planas, J.V., Athos, J., Goetz, F.W., and Swanson, P. (2000). Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biol. Reprod.* 62, 1262–1269.

Powell, R.H., Galiguis, J., Biancardi, M.N., Pope, C.E., Leibo, S.P., Wang, G., and Gomez, M.C. (2016). Phenotypic and Molecular Characterization of Domestic Cat (*Felis catus*) Spermatogonial Stem Cells. *Biol. Reprod.* 95, 20–20.

Pradhan, A., and Olsson, P.-E. (2014). Juvenile ovary to testis transition in zebrafish involves inhibition of ptes. *Biol. Reprod.* 91, 33.

Pradhan, A., and Olsson, P.-E. (2015). Zebrafish sexual behavior: role of sex steroid hormones and prostaglandins. *Behav. Brain Funct. BBF* 11, 23.

Procarione, L.S., Barry, T.P., and Malison, J.A. (1999). Effects of High Rearing Densities and Loading Rates on the Growth and Stress Responses of Juvenile Rainbow Trout. *North Am. J. Aquac.* 61, 91–96.

Pudney, J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 32, 459–497.

### -Q-

Qiao, L., Kinney, B., Schaack, J., and Shao, J. (2011). Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes. *Diabetes* 60, 1519–1527.

### -R-

Rajkovic, A., Yan M S, C., Klysik, M., and Matzuk, M. (2001). Discovery of germ cell-specific transcripts by expressed sequence tag database analysis. *Fertil. Steril.* 76, 550–554.

Ramasamy, S., Wang, H., Quach, H.N.B., and Sampath, K. (2006). Zebrafish *Staufen1* and *Staufen2* are required for the survival and migration of primordial germ cells. *Dev. Biol.* 292, 393–406.

Ramsay, J.M., Feist, G.W., Varga, Z.M., Westerfield, M., Kent, M.L., and Schreck, C.B. (2009). Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. *Aquac. Amst. Neth.* 297, 157–162.

Rauch, G.-J., Granato, M., and Haffter, P. (1997). A polymorphic zebrafish line for genetic mapping using SSLPs on high-percentage agarose gels. *Tech. Tips Online* 2, 148–150.

Raverot, G., Weiss, J., Park, S.Y., Hurley, L., and Jameson, J.L. (2005). *Sox3* expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev. Biol.* 283, 215–225.

Raymond, C.S., Murphy, M.W., O'Sullivan, M.G., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2000). *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 14, 2587–2595.

Raynaud, C.M., Butler, J.M., Halabi, N.M., Ahmad, F.S., Ahmed, B., Rafii, S., and Rafii, A. (2013). Endothelial cells provide a niche for placental hematopoietic stem/progenitor cell expansion through broad transcriptomic modification. *Stem Cell Res.* 11, 1074–1090.

Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.* 4, 690–700.

Reik, W., and Surani, M.A. (2015). Germline and Pluripotent Stem Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.

Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., and Gutiérrez, J. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 20–24.

Renault, A.D., and Lehmann, R. (2006). Follow the fatty brick road: lipid signaling in cell migration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 348–354.

Renault, A.D., Sigal, Y.J., Morris, A.J., and Lehmann, R. (2004). Soma-germ line competition for lipid phosphate uptake regulates germ cell migration and survival. *Science* 305, 1963–1966.

Ricardo, S., and Lehmann, R. (2009). An ABC transporter controls export of a *Drosophila* germ cell attractant. *Science* 323, 943–946.

Richardson, B.E., and Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 37–49.

Rocha, A., Zanuy, S., and Gómez, A. (2016). Conserved Anti-Müllerian Hormone: Anti-Müllerian Hormone Type-2 Receptor Specific Interaction and Intracellular Signaling in Teleosts. *Biol. Reprod.* 94, 141.

de Rooij, D.G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reprod. Camb. Engl.* 121, 347–354.

de Rooij, D.G., and Griswold, M.D. (2012). Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J. Androl.* 33, 1085–1095.

de Rooij, D.G., and Russell, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21, 776–798.

- Roosen-Runge, E.C. (1969). Comparative aspects of spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 1, Suppl 1:24-31.
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686–692.
- Rozwadowska, N., Fiszer, D., Jedrzejczak, P., Kosicki, W., and Kurpisz, M. (2007). Interleukin-1 superfamily genes expression in normal or impaired human spermatogenesis. *Genes Immun.* 8, 100–107.
- Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., and Wylie, C. (2006). Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Dev. Camb. Engl.* 133, 4861–4869.
- Russell, L., and Clermont, Y. (1976). Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *Anat. Rec.* 185, 259–278.
- Russell, L.D., Malone, J.P., and MacCurdy, D.S. (1981). Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in the rat. *Tissue Cell* 13, 349–367.
- Ryan, G.R., Dai, X.M., Dominguez, M.G., Tong, W., Chuan, F., Chisholm, O., Russell, R.G., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (2001). Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood* 98, 74–84.
- S-
- Sabour, D., Xu, X., Chung, A.C.K., Menuet, D.L., Ko, K., Tapia, N., Araúzo-Bravo, M.J., Gentile, L., Greber, B., Hübner, K., et al. (2014). Germ Cell Nuclear Factor Regulates Gametogenesis in Developing Gonads. *PLOS ONE* 9, e103985.
- Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H., and Saga, Y. (2009). The RNA-Binding Protein NANOS2 Is Required to Maintain Murine Spermatogonial Stem Cells. *Science* 325, 1394–1398.
- Sada, A., Hasegawa, K., Pin, P.H., and Saga, Y. (2012). NANOS2 acts downstream of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling to suppress differentiation of spermatogonial stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 280–291.
- Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S.C., van Daalen, S.K.M., Korver, C.M., Roepers-Gajadien, H.L., Koruji, M., Hovingh, S., de Reijke, T.M., de la Rosette, J.J.M.C.H., van der Veen, F., et al. (2009). Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* 302, 2127–2134.
- Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., Tanaka, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2006). Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 691–699.
- Saitou, M., and Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Sakai, N. (2006). In vitro male germ cell cultures of zebrafish. *Methods San Diego Calif* 39, 239–245.
- Sakiyama, J., Yokouchi, Y., and Kuroiwa, A. (2001). HoxA and HoxB cluster genes subdivide the digestive tract into morphological domains during chick development. *Mech. Dev.* 101, 233–236.
- Salzmann, V., Inaba, M., Cheng, J., and Yamashita, Y.M. (2013). Lineage tracing quantification reveals symmetric stem cell division in *Drosophila* male germline stem cells. *Cell. Mol. Bioeng.* 6, 441–448.
- Sambroni, E., Le Gac, F., Breton, B., and Lareyre, J.-J. (2007). Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. *J. Endocrinol.* 195, 213–228.
- Sambroni, E., Lareyre, J.-J., and Le Gac, F. (2013a). Fsh controls gene expression in fish both independently of and through steroid mediation. *PloS One* 8, e76684.
- Sambroni, E., Rolland, A.D., Lareyre, J.-J., and Le Gac, F. (2013b). FSH and LH have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. *J. Mol. Endocrinol.* 50, 1–18.

- Sánchez-Sánchez, A.V., Camp, E., García-España, A., Leal-Tassias, A., and Mullor, J.L. (2010). Medaka Oct4 is expressed during early embryo development, and in primordial germ cells and adult gonads. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 672–679.
- Santos, A.C., and Lehmann, R. (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr. Biol.* CB 14, R578-589.
- Santos Nassif Lacerda, S.M., Costa, G.M.J., da Silva, M. de A., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Peixoto, M.T.D., Resende, R.R., and de França, L.R. (2013a). Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 95–106.
- Santos Nassif Lacerda, S.M., Costa, G.M.J., da Silva, M. de A., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Peixoto, M.T.D., Resende, R.R., and de França, L.R. (2013b). Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 95–106.
- Saunders, P.T.K., Turner, J.M.A., Ruggiu, M., Taggart, M., Burgoyne, P.S., Elliott, D., and Cooke, H.J. (2003). Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. *Reprod. Camb. Engl.* 126, 589–597.
- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2007). A novel transforming growth factor-beta superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Biol.* 301, 266–275.
- Schlinger, B.A., and Arnold, A.P. (1992). Plasma sex steroids and tissue aromatization in hatchling zebra finches: implications for the sexual differentiation of singing behavior. *Endocrinology* 130, 289–299.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.
- Schöler, H.R., Dressler, G.R., Balling, R., Rohdewohld, H., and Gruss, P. (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* 9, 2185–2195.
- Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., França, L.R., Vilela, D.A.R., and Godinho, H.P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis--evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol. Reprod.* 73, 891–898.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., and Miura, T. (2010a). Spermatogenesis in fish. *Fish Reprod.* 165, 390–411.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., and Miura, T. (2010b). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411.
- Scott, A.P., Sumpter, J.P., and Stacey, N. (2010). The role of the maturation-inducing steroid, 17,20 $\beta$ -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *J. Fish Biol.* 76, 183–224.
- Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C., Thienpont, B., Dean, W., and Reik, W. (2012). The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol. Cell* 48, 849–862.
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., and Matsui, Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.* 278, 440–458.
- Sertoli, E. (1865). Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. *Morgagni* 7 31–40.
- Seydoux, G., and 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*. *Dev. Camb. Engl.* 124, 2191–2201.

- Shang, M., Su, B., Lipke, E.A., Perera, D.A., Li, C., Qin, Z., Li, Y., Dunn, D.A., Cek, S., Peatman, E., et al. (2015). Spermatogonial stem cells specific marker identification in channel catfish, *Ictalurus punctatus* and blue catfish, *I. furcatus*. *Fish Physiol. Biochem.* *41*, 1545–1556.
- Sheng, X.R., and Matunis, E. (2011). Live imaging of the *Drosophila* spermatogonial stem cell niche reveals novel mechanisms regulating germline stem cell output. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3367–3376.
- Shibata, Y., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Usami, T., Nakamoto, M., Matsuda, M., and Nagahama, Y. (2010). Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expr. Patterns GEP* *10*, 283–289.
- Shields, A.R., Spence, A.C., Yamashita, Y.M., Davies, E.L., and Fuller, M.T. (2014). The actin-binding protein profilin is required for germline stem cell maintenance and germ cell enclosure by somatic cyst cells. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 73–82.
- Shinohara, T., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (1999).  $\beta$ 1- and  $\alpha$ 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 5504–5509.
- Shinohara, T., Orwig, K.E., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2000). Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 8346–8351.
- Shinohara, T., Ishii, K., and Kanatsu-Shinohara, M. (2011). Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro. *J. Reprod. Dev.* *57*, 288–295.
- Shukla, K.K., Mahdi, A.A., and Rajender, S. (2012). Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front. Biosci. Elite Ed.* *4*, 746–754.
- Siccardi, A.J., Garris, H.W., Jones, W.T., Moseley, D.B., D'Abramo, L.R., and Watts, S.A. (2009). Growth and Survival of Zebrafish (*Danio rerio*) Fed Different Commercial and Laboratory Diets. *Zebrafish* *6*, 275–280.
- Sirianni, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andò, S., Maggiolini, M., and Pezzi, V. (2008). The Novel Estrogen Receptor, G Protein-Coupled Receptor 30, Mediates the Proliferative Effects Induced by 17 $\beta$ -Estradiol on Mouse Spermatogonial GC-1 Cell Line. *Endocrinology* *149*, 5043–5051.
- Skaar, K.S., Nóbrega, R.H., Magaraki, A., Olsen, L.C., Schulz, R.W., and Male, R. (2011). Proteolytically activated, recombinant anti-mullerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology* *152*, 3527–3540.
- Skinner, M.K., and Griswold, M.D. (2004). *Sertoli Cell Biology* (Academic Press).
- Smith, K.N., and Nicolas, A. (1998). Recombination at work for meiosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 200–211.
- Snee, M.J., and Macdonald, P.M. (2004). Live imaging of nuage and polar granules: evidence against a precursor-product relationship and a novel role for Oskar in stabilization of polar granule components. *J. Cell Sci.* *117*, 2109–2120.
- So, W.-K., Kwok, H.-F., and Ge, W. (2005). Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits--their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol. Reprod.* *72*, 1382–1396.
- Sonar, S., and Lal, G. (2015). Role of Tumor Necrosis Factor Superfamily in Neuroinflammation and Autoimmunity. *Front. Immunol.* *6*, 364.
- Song, H.-W., and Wilkinson, M.F. (2014). Transcriptional control of spermatogonial maintenance and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* *30*, 14–26.
- Song, M., and Gutzeit, H.O. (2003). Effect of 17-alpha-ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. *Dev. Growth Differ.* *45*, 327–337.
- Song, J., Kang, S.M., Kim, E., Kim, C.-H., Song, H.-T., and Lee, J.E. (2015). Adiponectin receptor-mediated signaling ameliorates cerebral cell damage and regulates the neurogenesis of neural stem cells at high glucose concentrations: an in vivo and in vitro study. *Cell Death Dis.* *6*, e1844.

Spadella, M.A., Oliveira, C., and Quagio-Grassiotto, I. (2006). Occurrence of biflagellate spermatozoa in Cetopsidae, Aspredinidae, and Nematogenyidae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). *Zoomorphology* 125, 135–145.

Spinnler, K., Köhn, F.M., Schwarzer, U., and Mayerhofer, A. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25, 2181–2187.

Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98–104.

Srinivasan, S., Mahowald, A.P., and Fuller, M.T. (2012). The receptor tyrosine phosphatase Lar regulates adhesion between *Drosophila* male germline stem cells and the niche. *Dev. Camb. Engl.* 139, 1381–1390.

Starz-Gaiano, M., and Lehmann, R. (2001). Moving towards the next generation. *Mech. Dev.* 105, 5–18.

Stein, J.A., Broihier, H.T., Moore, L.A., and Lehmann, R. (2002). Slow as molasses is required for polarized membrane growth and germ cell migration in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 129, 3925–3934.

St-Hilaire, S., Ribble, C., Whitaker, D.J., and Kent, M. (1998). Prevalence of *Kudoa* thyr sites in sexually mature and immature pen-reared Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in British Columbia, Canada. *Aquaculture* 162, 69–77.

Suomalainen, L.-R., Tirola, M.A., and Valtonen, E.T. (2005). Influence of rearing conditions on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 28, 271–277.

Suzuki, H., Ahn, H.W., Chu, T., Bowden, W., Gassei, K., Orwig, K., and Rajkovic, A. (2012). SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. *Dev. Biol.* 361, 301–312.

Syrjänen, J.L., Pellegrini, L., and Davies, O.R. (2014). A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *eLife* 3, e02963.

#### -T-

Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodama, T., Hamakubo, T., and Shinkai, Y. (2005). Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev.* 19, 815–826.

Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., and Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech. Dev.* 113, 29–39.

Takahashi, H. (1977). Juvenile Hermaphroditism in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. 北海道大學水産學部研究彙報 Bull. Fac. Fish. HOKKAIDO Univ. 28, 57–65.

Takase, H.M., and Nusse, R. (2016). Paracrine Wnt/ $\beta$ -catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E1489-1497.

Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Morimoto, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Jijiwa, M., Takahashi, M., Ogura, A., and Shinohara, T. (2015). Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cell Rep.* 4, 489–502.

Tam, P.P., and Snow, M.H. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64, 133–147.

Tanaka, M., Kinoshita, M., Kobayashi, D., and Nagahama, Y. (2001). Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2544–2549.

Tanaka, S.S., Yamaguchi, Y.L., Tsoi, B., Lickert, H., and Tam, P.P.L. (2005). IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev. Cell* 9, 745–756.

Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara, M., Lei, Z., Rao, C.V., and Shinohara, T. (2016). The Luteinizing Hormone-Testosterone Pathway Regulates Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal by Suppressing WNT5A Expression in Sertoli Cells. *Stem Cell Rep.* 7, 279–291.



- Tanentzapf, G., Devenport, D., Godt, D., and Brown, N.H. (2007). Integrin-dependent anchoring of a stem-cell niche. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1413–1418.
- Tapia, N., Reinhardt, P., Duemmler, A., Wu, G., Araúzo-Bravo, M.J., Esch, D., Greber, B., Cojocaru, V., Rascon, C.A., Tazaki, A., et al. (2012). Reprogramming to pluripotency is an ancient trait of vertebrate Oct4 and Pou2 proteins. *Nat. Commun.* *3*, 1279.
- Taylor, H.S., Vanden Heuvel, G.B., and Igarashi, P. (1997). A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol. Reprod.* *57*, 1338–1345.
- Tazuke, S.I., Schulz, C., Gilboa, L., Fogarty, M., Mahowald, A.P., Guichet, A., Ephrussi, A., Wood, C.G., Lehmann, R., and Fuller, M.T. (2002). A germline-specific gap junction protein required for survival of differentiating early germ cells. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 2529–2539.
- Terada, N., Ohno, N., Saitoh, S., Saitoh, Y., Komada, M., Kubota, H., and Ohno, S. (2010). Involvement of a membrane skeletal protein, 4.1G, for Sertoli/germ cell interaction. *Reprod. Camb. Engl.* *139*, 883–892.
- Thorpe, J.L., Doitsidou, M., Ho, S.-Y., Raz, E., and Farber, S.A. (2004). Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGC0A reductase activity and prenylation. *Dev. Cell* *6*, 295–302.
- Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., and Marunouchi, T. (2007). CDH1 Is a Specific Marker for Undifferentiated Spermatogonia in Mouse Testes. *Biol. Reprod.* *76*, 130–141.
- Toledano, H., D'Alterio, C., Czech, B., Levine, E., and Jones, D.L. (2012). The let-7-Imp axis regulates ageing of the *Drosophila* testis stem-cell niche. *Nature* *485*, 605–610.
- Tothova, Z., and Gilliland, D.G. (2007). FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* *1*, 140–152.
- Tourtellotte, W.G., Nagarajan, R., Auyeung, A., Mueller, C., and Milbrandt, J. (1999). Infertility associated with incomplete spermatogenic arrest and oligozoospermia in *Egr4*-deficient mice. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 5061–5071.
- Tran, J., Brenner, T.J., and DiNardo, S. (2000). Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. *Nature* *407*, 754–757.
- Tran, V., Lim, C., Xie, J., and Chen, X. (2012). Asymmetric division of *Drosophila* male germline stem cell shows asymmetric histone distribution. *Science* *338*, 679–682.
- Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* *25*, 1105–1111.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* *28*, 511–515.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* *7*, 562–578.
- Trentin, A., Glavieux-Pardanaud, C., Douarin, N.M.L., and Dupin, E. (2004). Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4495–4500.
- Tripathi, R., Mishra, D.P., and Shaha, C. (2009). Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J. Reprod. Immunol.* *83*, 31–35.
- Tsai, T.-L., Wang, B., Squire, M.W., Guo, L.-W., and Li, W.-J. (2015). Endothelial cells direct human mesenchymal stem cells for osteo- and chondro-lineage differentiation through endothelin-1 and AKT signaling. *Stem Cell Res. Ther.* *6*, 88.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., and Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* *301*, 1239–1241.

Tulina, N., and Matunis, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* 294, 2546–2549.

Tzung, K.-W., Goto, R., Saju, J.M., Sreenivasan, R., Saito, T., Arai, K., Yamaha, E., Hossain, M.S., Calvert, M.E.K., and Orbán, L. (2015). Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. *Stem Cell Rep.* 4, 61–73.

#### -U-

Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., and Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 137, 11–20.

Ueno, H., and Mori, H. (1990). Morphometrical analysis of Sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cycle in rats. *Biol. Reprod.* 43, 769–776.

#### -V-

Van Dissel-Emiliani, F.M., De Boer-Brouwer, M., and De Rooij, D.G. (1996). Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period. *Endocrinology* 137, 647–654.

Van Doren, M., Williamson, A.L., and Lehmann, R. (1998a). Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr. Biol. CB* 8, 243–246.

Van Doren, M., Brohier, H.T., Moore, L.A., and Lehmann, R. (1998b). HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. *Nature* 396, 466–469.

Vansandt, L.M., Livesay, J.L., Dickson, M.J., Li, L., Pukazhenth, B.S., and Keefer, C.L. (2016). Conservation of spermatogonial stem cell marker expression in undifferentiated felid spermatogonia. *Theriogenology* 86, 1022–1035.e3.

Vijayan, M.M., and Leatherland, J.F. (1990). High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J. Endocrinol.* 124, 311–318.

Vilela, D. a. R., Silva, S.G.B., Peixoto, M.T.D., Godinho, H.P., and França, L.R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 187–190.

Viñas, J., and Piferrer, F. (2008). Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. *Biol. Reprod.* 79, 738–747.

#### -W-

Wagers, A.J. (2012). The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell* 10, 362–369.

Wakayama, T., and Iseki, S. (2009). Role of the spermatogenic-Sertoli cell interaction through cell adhesion molecule-1 (CADM1) in spermatogenesis. *Anat. Sci. Int.* 84, 112–121.

Wang, C., Dickinson, L.K., and Lehmann, R. (1994). Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 199, 103–115.

Wang, D.-S., Jiao, B., Hu, C., Huang, X., Liu, Z., and Cheng, C.H.K. (2008). Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 336–341.

Wang, S., Wang, X., Wu, Y., and Han, C. (2015). IGF-1R signaling is essential for the proliferation of cultured mouse spermatogonial stem cells by promoting the G2/M progression of the cell cycle. *Stem Cells Dev.* 24, 471–483.

Watanabe, A., and Onitake, K. (1995). Changes in the distribution of fibroblast growth factor in the teleostean testis during spermatogenesis. *J. Exp. Zool.* 272, 475–483.

Weber, G.M., Moore, A.B., and Sullivan, C.V. (2007). In vitro actions of insulin-like growth factor-I on ovarian follicle maturation in white perch (*Morone americana*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 180–187.

Wedemeyer, G.A. (1996). *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems* (Boston, MA: Springer US).

Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2003a). dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol. CB* 13, 1429–1434.

Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2003b). dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol. CB* 13, 1429–1434.

Williamson, A., and Lehmann, R. (1996). Germ cell development in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 365–391.

Wolbach, S.B., and Howe, P.R. (1925). TISSUE CHANGES FOLLOWING DEPRIVATION OF FAT-SOLUBLE A VITAMIN. *J. Exp. Med.* 42, 753–777.

Wong, T.-T., and Collodi, P. (2013). Effects of specific and prolonged expression of zebrafish growth factors, Fgf2 and Lif in primordial germ cells in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 347–351.

Wong, T.-T., Tesfamichael, A., and Collodi, P. (2013). Production of zebrafish offspring from cultured female germline stem cells. *PLoS One* 8, e62660.

Wu, J., Zhang, Y., Tian, G.G., Zou, K., Lee, C.M., Yu, Q., and Yuan, Z. (2008). Short-type PB-cadherin promotes self-renewal of spermatogonial stem cells via multiple signaling pathways. *Cell. Signal.* 20, 1052–1060.

Wu, X., Oatley, J.M., Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2010). The POU domain transcription factor POU3F1 is an important intrinsic regulator of GDNF-induced survival and self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 82, 1103–1111.

Wu, X., Goodyear, S.M., Tobias, J.W., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2011). Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires ETV5-Mediated Downstream Activation of Brachyury in Mice. *Biol. Reprod.* 85, 1114–1123.

#### -X-

Xiong, W., Wang, H., Wu, H., Chen, Y., and Han, D. (2009). Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reprod. Camb. Engl.* 137, 469–479.

#### -Y-

Yabe, T., Ge, X., and Pelegri, F. (2007). The zebrafish maternal-effect gene cellular atoll encodes the centriolar component sas-6 and defects in its paternal function promote whole genome duplication. *Dev. Biol.* 312, 44–60.

Yabe, T., Ge, X., Lindeman, R., Nair, S., Runke, G., Mullins, M.C., and Pelegri, F. (2009). The maternal-effect gene cellular island encodes aurora B kinase and is essential for furrow formation in the early zebrafish embryo. *PLoS Genet.* 5, e1000518.

Yadlapalli, S., and Yamashita, Y.M. (2013). Chromosome-specific nonrandom sister chromatid segregation during stem-cell division. *Nature* 498, 251–254.

Yamaguchi, A., Lee, K.H., Fujimoto, H., Kadomura, K., Yasumoto, S., and Matsuyama, M. (2006). Expression of the DMRT gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 1, 59–68.

Yamaguchi, S., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Sasaki, H., Nakatsuji, N., Saitou, M., and Tada, T. (2009). Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* 136, 4011–4020.

- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* *40*, 1016–1022.
- Yamamoto, H., Ochiya, T., Tamamushi, S., Toriyama-Baba, H., Takahama, Y., Hirai, K., Sasaki, H., Sakamoto, H., Saito, I., Iwamoto, T., et al. (2002). HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity. *Oncogene* *21*, 899–908.
- Yamashita, Y.M., and Fuller, M.T. (2008). Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division. *J. Cell Biol.* *180*, 261–266.
- Yamashita, Y.M., Jones, D.L., and Fuller, M.T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* *301*, 1547–1550.
- Yang, Q.-E., Kim, D., Kaucher, A., Oatley, M.J., and Oatley, J.M. (2013). CXCL12-CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells. *J. Cell Sci.* *126*, 1009–1020.
- Yang, X., Yue, H., Ye, H., Li, C., and Wei, Q. Identification of a germ cell marker gene, the dead end homologue, in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*. *Gene*.
- Yano, A., Suzuki, K., and Yoshizaki, G. (2008). Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biol. Reprod.* *78*, 151–158.
- Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Ishida, M., and Yoshizaki, G. (2013). The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. *Mol. Reprod. Dev.* *80*, 871–880.
- Yeh, J.R., Zhang, X., and Nagano, M.C. (2011). Wnt5a is a cell-extrinsic factor that supports self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *J. Cell Sci.* *124*, 2357–2366.
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., and Zhao, G.Q. (2000). Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *14*, 1053–1063.
- Yoon, C., Kawakami, K., and Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 3157–3165.
- Yoshida, S., Sukeno, M., and Nabeshima, Y.-I. (2007). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* *317*, 1722–1726.
- Yoshikawa, H., Morishima, K., Fujimoto, T., Saito, T., Kobayashi, T., Yamaha, E., and Arai, K. (2009). Chromosome doubling in early spermatogonia produces diploid spermatozoa in a natural clonal fish. *Biol. Reprod.* *80*, 973–979.
- Young, J.C., Wakitani, S., and Loveland, K.L. (2015). TGF- $\beta$  superfamily signaling in testis formation and early male germline development. *Semin. Cell Dev. Biol.* *45*, 94–103.
- Youngren, K.K., Coveney, D., Peng, X., Bhattacharya, C., Schmidt, L.S., Nickerson, M.L., Lamb, B.T., Deng, J.M., Behringer, R.R., Capel, B., et al. (2005). The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* *435*, 360–364.
- Yu, J., Lan, X., Chen, X., Yu, C., Xu, Y., Liu, Y., Xu, L., Fan, H.-Y., and Tong, C. (2016). Protein synthesis and degradation are essential to regulate germline stem cell homeostasis in *Drosophila* testes. *Development* *143*, 2930–2945.

-Z-

- Zalokar, M. (1976). Autoradiographic study of protein and RNA formation during early development of *Drosophila* eggs. *Dev. Biol.* *49*, 425–437.
- Zalokar, M., and Erk, I. (1976). Division and migration of nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J. Microsc. Biol. Cell.*

- Zarkower, D. (2001). Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat. Rev. Genet.* *2*, 175–185.
- Zebedee, Z., and Hara, E. (2001). Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* *20*, 8317–8325.
- Zeidler, M.P., Bach, E.A., and Perrimon, N. (2000). The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Oncogene* *19*, 2598–2606.
- Zhang, T., Rawson, D.M., Pekarsky, I., Blais, I., and Lubzens, E. (2007). Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In *The Fish Oocyte*, P.J. Babin, D.J. Cerdà, and E. Lubzens, eds. (Springer Netherlands), pp. 411–436.
- Zhang, X., Yalcin, S., Lee, D.-F., Yeh, T.-Y.J., Lee, S.-M., Su, J., Mungamuri, S.K., Rimmelé, P., Kennedy, M., Sellers, R., et al. (2011). FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1092–1099.
- Zhao, G.Q., Deng, K., Labosky, P.A., Liaw, L., and Hogan, B.L. (1996). The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev.* *10*, 1657–1669.
- Zheng, Y., Zhang, Y., Qu, R., He, Y., Tian, X., and Zeng, W. (2014). Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction* *147*, R65–R74.
- Zhou, Q., and Griswold, M.D. (2008). Regulation of spermatogonia. In *StemBook*, (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute), p.
- Zhou, H., Yong, J., Sun, X., Wang, C., Yang, W., Zhang, P., Zhu, J., Shi, C., Ding, M., and Deng, H. (2008). A human endothelial cell feeder system that efficiently supports the undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells. *Differ. Res. Biol. Divers.* *76*, 923–930.
- Zhou, Q., Li, T., and Price, D.H. (2012). RNA polymerase II elongation control. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 119–143.
- Zhou, W., Bolden-Tiller, O.U., Shao, S.H., Weng, C.C., Shetty, G., AbuElhija, M., Pakarinen, P., Huhtaniemi, I., Momin, A.A., Wang, J., et al. (2011). Estrogen-regulated genes in rat testes and their relationship to recovery of spermatogenesis after irradiation. *Biol. Reprod.* *85*, 823–833.
- Zimmermann, C., Stévant, I., Borel, C., Conne, B., Pitetti, J.-L., Calvel, P., Kaessmann, H., Jégou, B., Chalmel, F., and Nef, S. (2015). Research resource: the dynamic transcriptional profile of sertoli cells during the progression of spermatogenesis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *29*, 627–642.
- Zou, S., Kamei, H., Modi, Z., and Duan, C. (2009). Zebrafish IGF genes: gene duplication, conservation and divergence, and novel roles in midline and notochord development. *PLoS One* *4*, e7026.

# **Annexes**

## Annexe 1

### Valorisation des résultats

#### **Publications**

- Molecular signature and stemness properties of A paired spermatogonia in zebrafish. E.Curran, A.Gautier, T.Saito, A.Patinote, A.Depincé, C.Labbé, F.Le Gac, JJ.Lareyre (Soumit à Cell : Stem Cell)
- Rnaseq based transcriptome analysis provide news insights into paracrine factors involved in SSC fate. E.Curran, F.Chamel, F.Le Gac, JJ.Lareyre. (Soumis prochainement à BMC genomics)

#### **Participation à des congrès internationaux**

- Isolation and molecular characterization of Sertoli and undifferentiated spermatogonial cell populations using GFP-expressing transgenic zebrafish lines. Edouard Curran, Aude Gautier, Florence Le Gac, Jean-Jacques Lareyre. ReproSciences 2015, Rennes (France), 13 au 15 avril 2015. (Poster et présentation oral).
- Molecular signature and stemness properties of A paired spermatogonia in zebrafish. Edouard Curran, Aude Gautier, Taiju Saito, Amélie Patinote, Alexandra Depincé, Catherine Labbé, Florence Le Gac, Jean-Jacques Lareyre. 5th International Workshop on Biology of Fish Gametes, Ancona (Italie), 7 au 11 septembre 2015. (Présentation oral)
- Stemness properties and molecular signature of paired spermatogonia in adult zebrafish. Edouard Curran, Aude Gautier, Taiju Saito, Amélie Patinote, Alexandra Depincé, Catherine Labbé, Florence Le Gac, Jean-Jacques Lareyre. 19th European Testis Workshop, Saint-Malo (France), 11 au 15 juin 2016. (Présentation oral)
- Stemness properties and molecular signature of paired spermatogonia in adult zebrafish. Edouard Curran, Aude Gautier, Taiju Saito, Amélie Patinote, Alexandra Depincé, Catherine Labbé, Florence Le Gac, Jean-Jacques Lareyre. Germline Stem Cells Conference, Abcam, San-Francisco (USA), 19 au 21 juin 2016 (Poster et présentation oral)

#### **Co-encadrement**

- Océanne Vaugrente Vaugrente, étudiante en DUT Génie biologique option Analyses biologiques et biochimiques (Caen). « Etude moléculaire des cellules spermatogonial chez le zebrafish »
- Kilian Petitjean Stagiaire Master 1 – 2 mois (mai - juin 2016) » Recherche de marqueurs spécifiques des spermatogonies chez le poisson zèbre par les approches de qPCR et HIT »

## Annexe 2 : Poster présenté à Reprosience.



# Isolation and molecular characterization of Sertoli and undifferentiated spermatogonial cell populations using GFP-expressing transgenic zebrafish lines.



Edouard Curran, Aude Gautier, Florence Le Gac, Jean-Jacques Lareyre

<sup>1</sup> INRA UPR1037 (Fish Physiology and Genomics), BIOSIT, Ouest-Genopole, Campus de Beaulieu, Rennes, France.

### Background

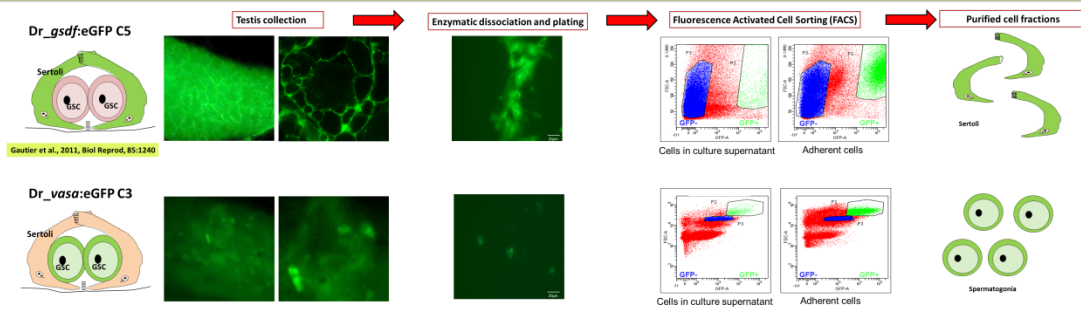
Spermatogonial stem cells (SSCs) are at the source of the sperm production throughout the life of the adult males. SSCs either remain quiescent or proliferate to self-renew or to progressively differentiate giving rise to spermatozoa. However, SSCs are not autonomous cells and their survival and cell fate are regulated by cell to cell interactions involving paracrine factors released from the surrounding somatic Sertoli cells. In fish, SSCs are poorly characterized at the molecular level and the paracrine factors controlling their cell fate remain little known.

### Objective

The objective of the present study was to establish a reliable procedure to isolate for the first time cell fractions containing SSCs and Sertoli cells from GFP-expressing transgenic zebrafish lines. The presence of putative SSCs in the purified spermatogonial cells fraction was investigated using SSCs markers proposed either in fish and/or in mammals. The purified cell fractions are expected to be valuable tools to identify membrane bound receptors and cognate ligands involved in cell to cell interactions.

### Transgenic zebrafish lines and cell isolation procedure

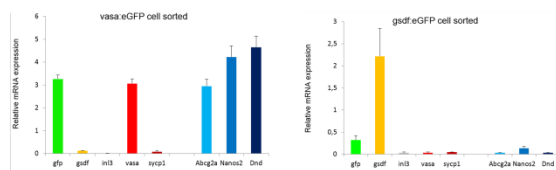
We have generated two transgenic zebrafish lines that express GFP mainly in single and paired A spermatogonia (Dr\_ *vasa*:eGFP C3) or in Sertoli cells (Dr\_ *gsdf*:eGFP C5).



Testes were collected from 4-5 month zebrafish males and cells were dissociated using collagenase and dispase. Spermatozoa and red blood cells were removed using a percoll gradient. A "differential plating" procedure was carried out overnight by plating the dissociated cells on gelatin-coated culture wells. This two-steps procedure lead to an increased proportion of the Sertoli and spermatogonial cells in the adherent cell fractions (about 6 % versus 0.1 %). Cells were sorted on a BD FACS Aria II cell sorter.

### Molecular characterization of the sorted cells

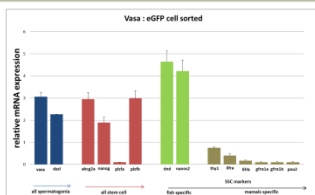
A panel of molecular markers was used to estimate the enrichment and/or the contamination of the sorted cell populations. Total ARN was extracted from the sorted cell fractions and expression of cell markers was determined using qPCR. Gene expression was normalized to 18S RNA expression and the adherent cell fractions were used as a reference.



Purified spermatogonial cells are not contaminated with somatic cells.  
Purified Sertoli cells are not contaminated with germ cells or Leydig cells.

### Molecular characterization of *vasa* : eGFP sorted cells

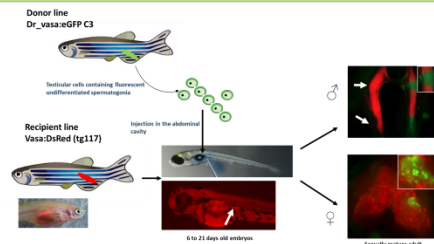
A more specific analyse has perform in *vasa* : egfp sorted cell. Expression of different cell markers specific of spermatogonia, Stem cell and SSC (mammals and fish) was determined by using qPCR. Gene expression was normalized to 18S RNA expression and the adherent cell fractions were used as a reference.



Purified spermatogonial cells are not contaminated with somatic cells. These cells express significant levels of some (*nanos2*, *plzf*, *abcg2*) but not all (*grf1*, *thy1*) spermatogonial stem cell markers proposed in other fish species and/or in mammals.

### Transplantation of testicular cells

The transplantation technique is a well suited approach to determine the stemness properties of purified germ cells. A transplantation procedure was first tested using dissociated testicular cells injected in the abdominal cavity of 6 or 21 days old embryos.



Age of the recipient embryos	Sex of the recipient embryos	
	MALE	FEMALE
	Successfully transplanted	Successfully transplanted
6 days	2/14	2/14
21 days	3/22	1/18

Our data indicate that the success rate of the transplantation remained low (about 10%) but similar between 6 and 21 days old zebrafish embryo.

### Conclusion/perspectives

This study demonstrates that the two transgenic zebrafish lines can be used to prepare cell fractions containing Sertoli or spermatogonial cells.

Our data suggest that the purified spermatogonial cells could contain spermatogonial stem cells (SSCs). The stemness properties of the purified cells will be studied using the transplantation assay described in the present study.

Overall, the purified cell fractions appear suitable for further investigations of the SSC and Sertoli cell transcriptomes using a high-throughput sequencing approach (RNAseq).



# Annexe 3 : Poster présenté au « Germlin stem cell conference ».



## Stemness properties and molecular signature of paired spermatogonia in adult zebrafish

Edouard CURRAN<sup>1</sup>, Aude GAUTIER<sup>1</sup>, Taiju SAITO<sup>2</sup>, Amélie PATINOTE<sup>1</sup>, Alexandra DEPINCE<sup>1</sup>, Catherine LABBE<sup>1</sup>, Florence LE GAC<sup>1</sup>, and Jean-Jacques LAREYRE<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> INRA UPR1037 LPGP, 35042 Rennes cedex, France; <sup>2</sup>University of Bohemia (Czech Republic).

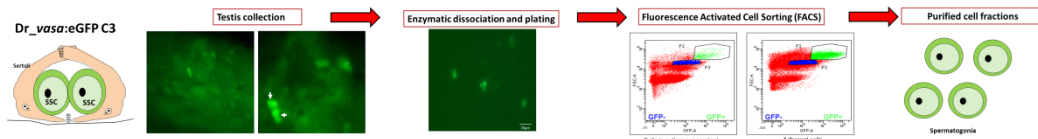
### Background

Research on spermatogonial stem cell (SSC) biology is a major issue to decipher intragonadal mechanisms involved in puberty onset and fertility. In addition, transplantation of cryopreserved SSC is the only operational technique allowing the regeneration of the whole genetic resources (both nuclear and mitochondrial) in fish. However, in contrast to mammals, SSC entities are not well characterized and the implementation of the biotechnologies based on SSC manipulation remain limited due to the absence of efficient isolation and *in vitro* amplification systems.

### Objectives

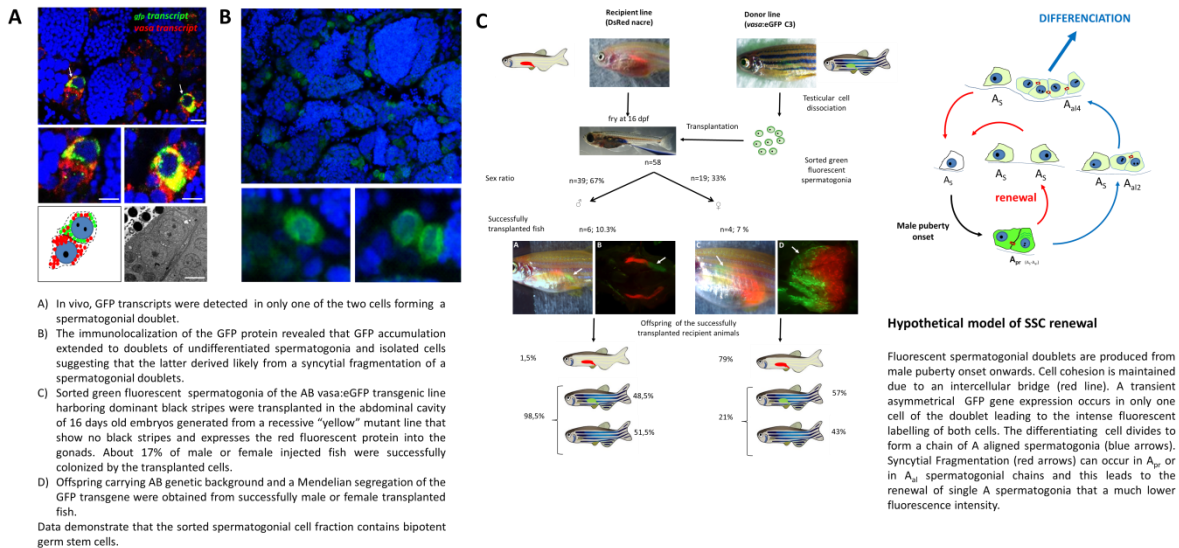
This study was aimed to characterize spermatogonial stem cell entities in a teleostean fish species and to identify candidate paracrine factors involved in the decision balance of SSC to self-renew or to differentiate.

### Isolation of undifferentiated spermatogonia from transgenic zebrafish lines

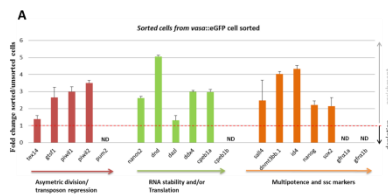


We have generated transgenic zebrafish lines that express GFP mainly in single and paired A spermatogonia (Dr\_vasa:eGFP C3). Testes were collected from 4-5 month zebrafish males and cells were dissociated using collagenase and dispase. Spermatozoa and red blood cells were removed using a 45% percoll cushion. A "differential plating" procedure was carried out overnight by plating the dissociated cells on gelatin-coated culture wells. This two-step procedure led to an increased proportion of the Sertoli and spermatogonial cells in the adherent cell fractions (about 6% versus 0.1%). Cells were sorted using a BD FACSAria II cell sorter.

### Sorted spermatogonia originate from asymmetrical doublets and show stemness properties after transplantation



### Sorted spermatogonia express genes involve in pluripotency but not all mammalian SSC markers



**A** Cells of spermatogonial cell fraction express significant levels of some (*nanos2*, *plzf*, *abcg2*) but not all (*gfra1*, *thy1*) spermatogonial stem cell markers proposed in other fish species and/or in mammals. **B** The transcriptome of sorted spermatogonia is similar but not identical to mammalian and chicken SSC. Note that the key Gfra1 regulatory pathway identified in mammals is not detected in zebrafish undifferentiated spermatogonia.

### Conclusions and perspectives

This study demonstrates that the transgenic zebrafish lines can be used to prepare cell fractions containing undifferentiated spermatogonia.

Based on the stemness properties, the molecular signature, and the spatio-temporal GFP expression pattern, sorted spermatogonia likely correspond to SSC similar to mammalian A paired spermatogonia.

Our study demonstrate for the first time in vertebrates that a transient asymmetrical gene expression can occur in the syncytium after cell division and before syncytial fragmentation.

The Gdnf/Gfra1 pathway is likely not a major key player in zebrafish SSC self renewal and transcriptomic analysis using RNAseq are undertaken to identify such key regulatory pathways and their evolutionary conservation.



Financial supports



Germline Stem Cells Conference  
June 19<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> 2016

## RÉSUMÉ

*Mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement impliqués dans la régulation du stock de cellules souches spermatogoniales chez le poisson-zèbre *Danio rerio*.*

Les capacités d'auto-renouvellement ou de différenciation progressive en gamètes des cellules souches spermatogoniales (SSC) sont indispensables à la production de spermatozoïdes tout au long de la vie des individus de sexe mâle. Les travaux réalisés au cours de la thèse ont eu pour objectif de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement impliqués dans le contrôle du devenir des SSC chez les poissons téléostéens. Grâce à une nouvelle lignée de poisson-zèbre transgénique exprimant la GFP sous le contrôle d'un nouveau fragment promoteur du gène *vasa*, nous avons caractérisé une sous-population de spermatogonies indifférenciées composées de doublets asymétriques. L'ensemble de nos observations suggère que ces doublets asymétriques constituent un pool de cellules souches recrutées pouvant soit poursuivre leur différenciation spermatique soit participer à la dynamique de renouvellement du stock de SSC. Une approche de séquençage à haut débit des transcrits exprimés au sein des spermatogonies indifférenciées fluorescentes et des cellules de Sertoli met en évidence la diversité des voies de régulation paracrine potentiellement impliquées dans le contrôle du devenir des SSC (molécules d'adhésion cellulaire, cytokines, facteurs de croissance...). Les analyses phylogénétiques montrent que certaines de ces voies de régulation sont conservées chez les Gnathostomes alors que d'autres ont été perdues chez les tétrapodes ou les mammifères seulement. Une approche comparée initiée chez la truite arc-en-ciel confirme l'intérêt générique des données acquises chez le poisson-zèbre pour les poissons d'intérêt agronomique.

**Mots-clés :** SSC, spermatogenèse, cellules-souche, poisson-zèbre, régulation

## ABSTRACT

*Cellular and molecular mechanisms potentially involved in the regulation of the pool of spermatogonial stem cells in the zebrafish *Danio Rerio*.*

By their ability to self-renew or differentiate into gametes, the spermatogonial stem cells (SSCs) are essential for sperm production throughout the life of male. The work done during the thesis had for objective the understanding of the cellular and molecular mechanisms potentially involved in the fate of the SSC in the teleost fish. With a new line of transgenic zebrafish expressing GFP under the control of a new gene promoter fragment *vasa*, we characterized a subpopulation of undifferentiated spermatogonia composed of asymmetric doublets. The observation of the GFP protein indicates that these doublets can fragment to generate isolated spermatogonia. Transplantation of fluorescent spermatogonial cells into the abdominal cavity of a recipient embryo shows that these cells have all functional properties of SSC. All our observations suggest that asymmetric doublet constitute a pool of stem cells with bivalent fate: they can continue their sperm differentiation or participate in the dynamic renewal of SSC pool. A *rnaseq* based transcriptome analysis of transcripts expressed in undifferentiated spermatogonia fluorescent and Sertoli cells highlights the diversity of paracrine regulatory pathways potentially involved in the control of the SSC (cell adhesion molecules, cytokines, growth factors, primary metabolites). Phylogenetic analyzes show that some of these regulatory pathways are well conserved among all Gnathostomes while others were lost in tetrapods or mammals only. A comparative approach initiated in rainbow trout generic confirms the interest of the data acquired in the zebrafish for fish of agronomic interest.

**Keywords:** SSC, spermatogenesis, stem-cell, zebrafish, regulatory.



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage  
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex  
Tél. : 02 23 48 50 00  
[www.agrocampus-ouest.fr](http://www.agrocampus-ouest.fr)

