



**HAL**  
open science

# Caractérisation du mode de reproduction pseudogame chez l'espèce de nématode *Mesorhabditis belari*

Manon Grosmaire

► **To cite this version:**

Manon Grosmaire. Caractérisation du mode de reproduction pseudogame chez l'espèce de nématode *Mesorhabditis belari*. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1151 . tel-01998715

**HAL Id: tel-01998715**

**<https://theses.hal.science/tel-01998715>**

Submitted on 29 Jan 2019

**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.



## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° accréditation**

**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Sciences de la vie

**Discipline** : Biologie cellulaire et moléculaire

Soutenue publiquement le 17/09/2018, par :

**Manon Christiane Danièle Grosmaire**

---

# **Caractérisation du mode de reproduction pseudogame chez l'espèce de nématode *Mesorhabditis belari***

---

Devant le jury composé de :

Schwander Tanja	Professeur Assistant	Université de Lausanne	Rapporteure
Landmann Frédéric	Chargé de Recherche	Université de Montpellier	Rapporteur
Félix Marie-Anne	Directeur de Recherche	ENS Paris	Examinatrice
Loppin Benjamin	Directeur de Recherche	UCBL Lyon 1	Examineur
Bonneton François	Maître de Conférence	UCBL Lyon 1	Examineur
Delattre Marie	Directeur de Recherche	ENS de Lyon	Directeur.rice de thèse

# Remerciements

---

Tout d'abord je souhaite adresser de chaleureux remerciements à tous les membres de mon jury de thèse, Dr. François Bonneton, Dr. Marie-Anne Félix, Dr. Frederic Landmann, Dr. Benjamin Loppin et Dr. Tanja Schwander, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie particulièrement Tanja Schwander et Frédéric Landmann pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit.

Les membres de mon comité de suivi de thèse:

Dr. Christian Braendle et Dr. Benjamin Loppin, pour leur aide et leur disponibilité. Nos discussions m'ont permis de prendre du recul sur mon sujet et m'ont permis d'orienter mes recherches sans (trop) m'éparpiller.

Nos collaborateurs:

Dr. Mark Blaxter pour avoir réalisé le séquençage, l'assemblage et une partie de l'analyse du génome de *M. belari*, mais aussi pour m'avoir permis de passer un mois dans son laboratoire et de participer à certaines étapes d'analyse.

Duncan Berger pour le travail qu'il a fourni concernant l'étude du génome, ainsi que pour m'avoir initiée sans relâche à la bioinformatique malgré ma naïveté envers tous les objets à écran.

Dr. Sujai Kumar pour m'avoir si bien accueillie chez lui, m'avoir soutenue pendant une période difficile, et pour m'avoir fait découvrir l'Ecosse et plus particulièrement Edimbourg.

Claire Burny et Dr. Laurent Modolo pour leur travail sur le génome des mâles et des femelles. Ainsi que leur patience pour m'aider à faire le lien entre résultats d'analyses bioinformatique et réalité biologique.

Dr. Marie-Anne Félix qui grâce à sa connaissance incroyable des nématodes nous a fourni les échantillons biologiques nécessaires à cette étude ainsi que de nombreux conseils précieux quant à l'orientation de mes recherches et l'analyse de certains résultats. Je tiens aussi à la remercier de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'y avoir permis de présenter mes travaux. Je remercie aussi les membres de son équipe Aurélien Richaud pour son aide indispensable et sa disponibilité concernant l'expérience de pyroséquençage, ainsi qu'Ahmed pour son accueil chaleureux.

Dr. Pierre-Henri Gouyon pour avoir accepté de travailler avec nous sur la question de l'ESS chez *M. belari*. Grâce à cela j'ai pu découvrir une thématique d'évolution qui m'était inconnue ainsi que de nombreux nouveaux concepts. Merci aussi à Marion Siegwald pour son travail de stage concernant ses questions.

Ma directrice de thèse:

Marie, merci de m'avoir proposé un sujet de thèse un peu fou, et de m'avoir soutenue depuis mon stage de master jusqu'à la fin de la rédaction de ma thèse. Ta disponibilité, ta patience, nos discussions conceptuelles ou techniques et tes nombreux

conseils de lecture m'ont permis de développer mon esprit scientifique et de travailler dans les meilleures conditions possibles. Tu m'as aussi donné l'occasion d'aborder le travail de chercheur dans sa globalité en me permettant de partir en congrès, de rédiger des abstracts ainsi que la première version de notre papier, de travailler en collaboration, de proposer des hypothèses et des moyens pour répondre à nos questions. Merci de m'avoir toujours encouragée, même lorsque ma motivation était moins importante, de m'avoir constamment aidée à m'améliorer et d'avoir su garder ton optimisme quant au projet quand les choses ne fonctionnaient pas vraiment comme on le voulait. Je garderai un formidable souvenir de cette thèse grâce à laquelle j'ai pu énormément apprendre à tes côtés.

#### Les membres passés et présents de l'équipe Delattre:

Caroline, avoir décidé de quitter le bureau jaune fut sans doute une des meilleures décisions de ma thèse. Pendant ces quatre années, ta gentillesse, ton enthousiasme et ton soutien constant m'ont permis de tenir dans les moments de doute. Merci pour l'aide précieuse que tu m'as apportée lorsque j'avais besoin de prendre du recul, lorsque j'ai réfléchi à l'après-thèse et même lorsque j'avais trop ou pas assez de bandes sur mes gels PCR. Merci aussi pour nos bavardages et nos séances de franche rigolade. Merci d'avoir supporté mon organisation optimale, mon rangement fabuleux, ma capacité exceptionnelle à passer des commandes dans les temps, mon idée de la décoration adéquate d'un bureau et mes séances de karaoké. Merci d'avoir été présente et toujours disponible lorsque j'ai fait face à des difficultés personnelles. Je l'écris pour que tu puisses le relire quand ça te manquera : Caroline, heureusement que tu étais là ! Et n'oublie pas que tu es l'as de trèfle !

Wallis et Soizic, merci pour vos encouragements, votre soutien et vos conseils lorsque je suis arrivée dans l'équipe, et surtout au moment de passer BMIC. Je garde un excellent souvenir de ce temps passé avec vous, et je regrette simplement qu'il se soit fini trop tôt.

Romain, durant ta présence parmi nous, si brève fut-elle, tu as toujours été disponible pour m'aider et me conseiller.

Nicolas et Hannah, vos travaux de stage m'ont permis de débroussailler pas mal de questions. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir appris, autant que je l'espère, vous avez appris.

Lilia, merci pour ton travail impressionnant sur la question des duplications.

#### Les nombreuses personnes qui m'ont aidé personnellement pendant mon parcours :

Fatima, ta volonté de me transmettre la rigueur scientifique et ton aide pendant toute mon année de M1 m'ont incontestablement apportée les bases pour réussir cette thèse.

Dr. Kathrin Giesler, Dr. Sandrine Giraud, Dr. Ludivine Walter, Dr. François Bonneton, Dr. Christophe Tréhin et toute l'équipe pédagogique de génétique de l'UCBL. Vous m'avez fait confiance et m'avez permis d'enseigner dans de nombreuses UE, pour tous les niveaux de la L1 au M1, mais aussi en travaux dirigés. Merci de m'avoir permis de me confronter à la réalité de l'enseignement à l'Université, ainsi que pour vos conseils pédagogiques.

Dr. Marie Sémon, merci de m'avoir permis de participer au projet « dans la peau d'un chercheur » grâce auquel j'ai pu aller à la rencontre des élèves de primaire.

L'équipe Palladino au complet pour avoir toujours répondu à mes questions concernant *C. elegans*, et pour les prêts, ou les dons, de matériel en tout genre pour l'étude des nématodes.

Roxane, merci pour ta gentillesse, ton humour et ton aide qui étaient très souvent le dernier rempart face à l'absurdité administrative.

Par ordre alphabétique, le « thésard crew » (qui se compose maintenant de nombreux jeunes docteurs...) :

Anissa, ta clingance est intrinsèque et indéniable. Ta capacité à inventer des mots et à me reconforter m'ont toujours donné ou redonné le sourire. Je suis heureuse d'avoir pu « vraiment » te rencontrer une fois en thèse, ç'aurait été terriblement honteux que ce ne soit pas le cas... Nous n'aurions pas eu alors l'occasion de partir à l'aventure... Merci aussi pour cette année de co-présidence, notre capacité à raccourcir les réunions devrait être brevetée je pense.

Charlotte, ton enthousiasme à toute épreuve restera pour moi une énigme et un objet de fascination. Merci beaucoup pour toute l'énergie positive que tu m'as apportée.

Clémence, Flore et Jérôme, grâce à vous j'ai compris que BMIC ne serait pas une tasse de thé, mais votre aide et vos encouragements m'ont permis d'obtenir ce concours ! Puis par la suite vous avez toujours su être là pour moi que ce soit pour faire des pauses sur les marches, râler quand les manips ne fonctionnaient pas, me conseiller et bien sur raconter des bêtises.

Delphine et Jo, que ce soit pour faire la fête ou pour me remonter le moral... puis faire la fête, vous avez toujours été disponibles, et je sais que l'on n'est jamais déçu lorsque l'on compte sur vous, vous pouvez peut-être arriver en retard... mais vous arrivez toujours !

Elodie, ta douceur et ta compréhension m'ont permis de traverser les épreuves personnelles auxquelles j'ai dû faire face. Merci pour tout ça.

Lamya, sans ta patience, ton efficacité et ton aide je n'aurais pas pu réaliser ces qPCR, n'oublies pas que tu es quelqu'un de formidable !

Léa, comme tu l'as dit, tu n'es certainement pas arrivée trop tard, mais plutôt pile au bon moment. Merci pour tout ton soutien indispensable durant la dernière ligne droite, merci aussi de m'avoir fait réaliser que l'on pouvait trouver des bouquets de toutes sortes de choses...

Marion, c'est avec regret que je ne te verrai plus pour discuter mécanismes de reproduction improbables, mais aussi cinéma, livre, musique... Je désespère aussi de trouver un jour quelqu'un qui aura le quart de tes compétences de sous-marin...

Sophie, ton esprit brillant m'étonnera toujours, et tes blagues me feront sans cesse rire... vive les vérandas !

Vincent, tu détiens la capacité de remonter le moral des troupes en prononçant une phrase, voire deux mots... j'en ai beaucoup profité alors merci pour cela.

Et enfin Marion, Flore, Clémence, Sophie, Chloé, Charlotte, Claire, Jérôme, Léa, Delphine, Jo, Axel, Claire, Vincent, Séverin, Elodie, Sonia, Steven, Julie, Angélique, Ludo. Merci pour ces très belles années passées à vos côtés, je garderai un souvenir mémorable de tous nos moments ensemble. Merci d'avoir supporté mes débordements d'énergie, mes surnoms improbables, mes boutades et mon rire au niveau sonore exceptionnel. Je ne saurai dire combien votre présence a été nécessaire à ma réussite.

Tous les membres de DÉMesures :

Particulièrement Audrey, Rémi, Pierre-Augustin, Théo et encore plus particulièrement Ulysse et Romain. Merci énormément pour cette aventure que vous avez éclairée de votre présence.

Ainsi que les représentants des doctorants: Léa, Marion, Gergès, Dorian, Charlotte

Merci également à toutes les personnes que j'ai régulièrement rencontrées au détour d'un couloir et qui m'ont permis d'améliorer, si tant est que ce soit encore possible, mes capacités de pipelette. Mégane, Fabien, Hélène, Gaël, Marie, Nathalie, Fabrice, Julieta, Domitille, Medhi, Carlos, Gérard, Franck.

Ce sont pour finir, mes amis et ma famille qui méritent toute ma gratitude

Justine, Filou, Audrey, Alice, Aline, Aude, Laurie, Daniela, Gaëtan, Méline. Cette thèse nous a souvent empêchés de nous voir autant que je l'aurais souhaité, mais je sais la chance que j'ai d'avoir des amis tels que vous.

Ma maman Isabelle qui a toujours su m'encourager, me soutenir et me guider. Tu as toujours souhaité le meilleur pour moi et tu m'as constamment aidée pour que je puisse y accéder, quelques lignes ne suffiront jamais à te remercier pour toutes ces années. Mes frères et sœurs Julian, Naïs et Théo qui dès leur plus jeune âge m'ont permis de tester mes capacités d'enseignante. Merci particulièrement à ma sœur Naïs qui m'a encouragée constamment pendant notre cohabitation durant cette dernière année de thèse et m'a préparé de bons petits plats. Ma grand-mère Christiane mon tonton Jacky pour avoir toujours été là pour moi, et pour m'avoir toujours accueillie avec de la bonne nourriture lorsque je rentrais le week-end.

Pour terminer, Lionel, sans qui je n'aurais jamais pu, ni commencer, ni finir cette thèse. Merci pour tes messages quotidiens d'encouragement, merci de t'être si bien occupé de moi pendant la rédaction, merci d'être constamment présent à mes côtés et de me soutenir dans tous mes choix. J'ai hâte que notre aventure Parisienne débute...

Ces remerciements ne se veulent bien évidemment pas exhaustifs en contenu, il m'aurait fallu sinon, rédiger une autre thèse pour cela.

# Résumé de la thèse

---

Chez les espèces pseudogames, les femelles utilisent les spermatozoïdes des mâles d'autres espèces pour activer leurs ovocytes et produire de nouvelles femelles sans utiliser l'ADN paternel. Ici, nous montrons un nouveau mode de reproduction pseudogame découvert chez l'espèce de nématode *Mesorhabditis belari* chez qui 8% de mâles conspécifiques sont présents. Ces mâles sont nécessaires pour féconder les ovocytes mais leurs gènes ne seront transmis qu'à leur fils et non à leurs filles. En effet, les femelles produisent deux types d'ovocytes, un type amphimixique où les ADN paternel et maternel constitueront le génome du zygote qui deviendra un mâle et un type gynogénétique où l'ADN paternel déclenchera le développement du zygote mais où seul l'ADN maternel constituera le génome du zygote qui deviendra une femelle. Ainsi, la production de mâles n'a pas d'incidence sur la diversité génétique des femelles. Par une approche de théorie des jeux, nous avons montré que la production des mâles dans une faible proportion constitue une stratégie évolutivement stable seulement si les fils sont plus enclins à se reproduire avec leurs sœurs. Nous avons validé cette prédiction par une approche expérimentale en montrant une préférence entre les frères et les sœurs pour la reproduction.

En parallèle, nous nous sommes intéressés aux bases moléculaires et cellulaires soutenant un tel mode de reproduction. Dans les embryons amphimixiques, la méiose femelle produit un pronoyau haploïde et la diploïdie est restaurée grâce au pronoyau paternel également haploïde. Dans les embryons gynogénétiques, l'ADN paternel ne se décondense pas, la méiose femelle est incomplète et produit un pronoyau diploïde afin de maintenir la diploïdie du zygote. Nous avons donc étudié le développement précoce des embryons de *M. belari*, et essayé de comprendre le type de déterminisme du sexe présent chez cette espèce.

<b>Remerciements .....</b>	<b>2</b>
<b>Résumé de la thèse.....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>14</b>
<b>1. La reproduction, un mécanisme fondamental pour la perpétuation de l'espèce .....</b>	<b>14</b>
1.1 La reproduction sexuée.....	15
1.2 La reproduction asexuée .....	16
1.2.1 <b>La parthénogénèse</b> .....	16
1.2.2 <b>Les parasites sexuels</b> .....	17
1.2.2.1 <b>L'androgénèse</b> .....	18
1.2.2.2 <b>La gynogénèse</b> .....	19
1.2.2.3 <b>L'hybridogénèse</b> .....	21
1.3 Maintien des parasites sexuels .....	22
1.4 Avantages et désavantages du sexe .....	24
1.5 Contraintes génétiques et cellulaires pour l'émergence de la reproduction asexuée.....	28
1.5.1 <b>Le maintien de la ploïdie</b> .....	28
1.5.2 <b>L'activation des ovocytes</b> .....	28
1.5.3 <b>Les centrosomes</b> .....	29
1.5.4 <b>Contraintes spécifiques à certaines espèces</b> .....	30
1.5.4.1 <b>L'empreinte génomique et les facteurs paternels</b> .....	30
1.5.4.2 <b>La production d'œufs résistants</b> .....	31
<b>2. La méiose .....</b>	<b>33</b>
2.1 La méiose chez <i>C. elegans</i> .....	34
2.1.1 <b>La cohésion des chromatides sœurs</b> .....	36
2.1.2 <b>L'appariement des chromosomes homologues</b> .....	37
2.1.3 <b>La synapse</b> .....	38
2.1.4 <b>La recombinaison</b> .....	39
2.1.5 <b>La séparation des chromosomes homologues</b> .....	42
2.2 Les méioses alternatives.....	43
2.2.1 <b>L'apomixie</b> .....	44
2.2.2 <b>Les méioses incomplètes</b> .....	44
2.2.2.1 <b>Méiose 1 unique</b> .....	45
2.2.2.2 <b>Meiose 2 unique</b> .....	45
2.2.3 <b>L'automixie</b> .....	48
2.2.3.1 <b>Duplication de gamètes</b> .....	48
2.2.3.2 <b>Fusion de gamètes</b> .....	48
2.2.4 <b>La méiose avec appariement des chromatides sœurs</b> .....	49
<b>3. Les spermatozoïdes et la contribution paternelle à la fécondation .....</b>	<b>51</b>
3.1 La formation des spermatozoïdes .....	51
3.1.1 <b>La compaction de l'ADN</b> .....	54
3.1.1.1 Chez les organismes modèles.....	56
3.1.1.2 <b>Chez <i>C. elegans</i></b> .....	59
3.1.2 <b>La transcription durant le processus de spermatogénèse</b> .....	61
3.2 Les étapes suivant la fécondation.....	61
3.2.1 L'élimination des SNBPs et l'incorporation des histones maternelles .....	62
3.2.2 <b>La formation d'un pronoyau male</b> .....	65
<b>4. Le déterminisme du sexe.....</b>	<b>66</b>
4.1 Le déterminisme génotypique du sexe.....	67
4.1.1 <b>Le déterminisme chromosomique</b> .....	67
4.1.2 <b>L'haplo-diploïdie</b> .....	71
4.2 Le déterminisme environnemental .....	72
4.3 Le déterminisme mixte .....	73
4.4 La transmission des chromosomes sexuels .....	74



4.4.1	<b>Le meiotic drive</b> .....	76
4.4.2	<b>Les chromosomes B</b> .....	78
4.5	Le parasite Wolbachia .....	79
<b>5.</b>	<b>Le système de reproduction pseudogame</b> .....	<b>80</b>
5.1	Le travail de Victor Nigon sur l'espèce <i>Mesorhabditis belari</i> et son mode de reproduction.....	81
5.2	La gamétogénèse chez <i>M. belari</i> .....	83
5.3	Le déterminisme du sexe chez <i>M. belari</i> .....	84
5.4	La proportion des sexes chez <i>M. belari</i> .....	86
5.5	Influence de facteurs chimiques sur la proportion des sexes .....	88
	<b>Objectifs de thèse</b> .....	<b>91</b>
	<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>93</b>
<b>1.</b>	<b>Souches</b> .....	<b>93</b>
<b>2.</b>	<b>Axénisation/synchronisation</b> .....	<b>93</b>
<b>3.</b>	<b>Croisements</b> .....	<b>94</b>
<b>4.</b>	<b>Production de phéromones</b> .....	<b>96</b>
<b>5.</b>	<b>Marquage par immunofluorescence</b> .....	<b>96</b>
5.1	Fixation des embryons .....	96
5.2	Fixation des gonades .....	97
5.3	Marquage.....	97
<b>6.</b>	<b>Imagerie</b> .....	<b>98</b>
6.1	Films en DIC .....	98
6.2	Confocal LSM 710 .....	99
<b>7.</b>	<b>Lyse de vers</b> .....	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>PCR et qPCR</b> .....	<b>99</b>
	<b>Résultats Partie I</b> .....	<b>100</b>
<b>1.</b>	<b>Caractérisation de la souche pseudogame <i>M. belari</i> JU2817</b> .....	<b>100</b>
1.1	Cycle de vie de <i>M. belari</i> .....	100
1.2	Stade d'adulte chez <i>M. belari</i> .....	101
1.3	Synchronisation de la population.....	102
1.4	Le taux de croisements produisant une descendance est faible .....	103
1.5	Mesure du pourcentage de mâles.....	104
1.6	Tentatives de modulation du pourcentage de mâles dans la population.....	104
1.6.1	Incidence de l'âge des pères.....	105
1.6.2	Incidence de la variation des facteurs environnementaux .....	108
1.6.3	Effet de l'ajout de phéromones .....	110
1.7	Mutagenèse Aléatoire .....	111
1.8	Les embryons amphimixiques ne donnent que des mâles et les embryons gynogénétiques que des femelles.....	112
1.9	Publication en révision.....	116
1.10	Conclusion.....	147
<b>2.</b>	<b>Validation de la préférence entre frères et sœurs pour la reproduction</b> ..	<b>148</b>
2.1	La distance génétique ainsi que l'environnement semblent jouer un rôle dans la préférence entre frères et sœurs .....	150
2.2	Les individus frères et sœurs produisent plus de mâles dans leur descendance.....	154
<b>3.</b>	<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>157</b>
3.1	Des facteurs génétiques et environnementaux semblent avoir un impact sur l'efficacité de croisement.....	157
3.2	Le nombre d'individus présents semble avoir un impact sur l'efficacité de croisement.....	158
3.3	L'impact de l'environnement sur le sex ratio reste inconnu.....	160
3.3.1	Les pères ne transmettent pas de matériel génétique à leurs filles .....	162

<b>Résultats partie II</b> .....	<b>164</b>
<b>1. Exploration des mécanismes cellulaires du mode de reproduction pseudogames chez <i>M. belari</i></b> .....	<b>164</b>
1.1 Objectifs.....	164
1.2 Séquençage de différentes espèces du genre <i>Mesorhabditis</i> .....	166
<b>2. Exploration du déterminisme du sexe chez les espèces du genre <i>Mesorhabditis</i></b> .....	<b>166</b>
2.1 Vérification de l'absence de <i>Wolbachia</i> chez <i>M. belari</i> .....	166
2.2 Recherche d'un chromosome sexuel chez <i>M. belari</i> par analyses cytologiques	168
2.2.1 Tentative de réalisation d'un caryotype.....	168
2.2.2 Recherche d'un lagging chromosome.....	171
2.2.3 Recherche d'un chromosome X par marquage de modifications d'histone.....	172
2.2.4 Recherche de chromosomes sexuels par analyse bioinformatique.....	174
2.2.4.1 Comparaison du génome des mâles et des femelles de JU2817.....	174
2.2.4.2 Validation des résultats de séquençage par PCR.....	176
2.2.4.3 Validation des résultats de PCR par qPCR.....	177
2.2.5 Recherche d'un meiotic drive.....	179
2.3 Conclusion et perspectives.....	181
2.3.1 L'analyse cytologique n'a pas permis de déterminer la présence d'un chromosome sexuel.....	181
2.3.2 L'analyse bioinformatique révèle la présence de marqueurs génétiques spécifiques des mâles.....	182
2.3.3 <i>M. belari</i> ne semble pas posséder de séquences spécifiques des femelles.....	184
2.3.4 La transmission d'un chromosome spécifique des mâles chez <i>M. belari</i> impliquerait un meiotic drive.....	184
<b>3. Le déroulement de la méiose femelle dans les deux catégories d'embryons</b>	<b>188</b>
3.1 Analyse cytologique de la gonade des femelles de <i>M. belari</i> .....	188
3.1.1 Il n'existe pas de différence entre les ovocytes avant la fécondation.....	189
3.1.2 Observations de figures de crossing-over.....	190
3.2 Analyse des différents embryons après la fécondation.....	191
3.2.1 Les embryons ne présentent pas tous la même organisation des chromosomes sur la plaque métaphasique.....	191
3.2.2 Une seule division de méiose semble se produire chez les embryons gynogénétiques.....	194
3.2.3 Plusieurs observations préliminaires permettent d'étayer l'hypothèse selon laquelle seule la méiose équationnelle se produirait dans les embryons gynogénétiques	197
3.3 Conclusions et perspectives.....	200
3.3.1 Les embryons gynogénétiques semblent subir une méiose 2 unique.....	200
3.3.2 La recombinaison homologue semble se produire chez <i>M. belari</i> .....	201
3.3.3 Comment produire deux catégories d'embryons ?.....	203
<b>4. Comment est contrôlé le devenir de l'ADN paternel ?</b> .....	<b>204</b>
4.1 Tentatives de marquages de protéines impliquées dans la condensation ou la décondensation de l'ADN paternel.....	204
4.2 Analyse de la formation du pronoyau mâle après la fécondation.....	205
4.3 Conclusions et perspectives.....	207
<b>5. Emergence de la pseudogamie</b> .....	<b>209</b>
5.1 Evolution du nombre de chromosomes au sein des <i>Mesorhabditis</i> .....	211
5.2 Analyse comparative de la gonade d'espèces pseudogames et gonochoriques	214
5.3 Analyse comparative du développement précoce des embryons d'une espèce pseudogame et d'une espèce gonochorique.....	215
5.4 Analyse du sex ratio dans les différentes espèces pseudogames.....	219
5.5 Conclusion et perspectives.....	221

5.5.1	Toutes les espèces pseudogames présentent un faible pourcentage de mâles ..	221
5.5.2	Les mâles des espèces pseudogames semblent présenter un déclin des caractères sexuels	221
5.5.3	Pistes pour l'étude de l'émergence de la pseudogamie .....	222
<b>Conclusion générale .....</b>		<b>225</b>
<b>Bibliographie .....</b>		<b>232</b>

---

# Liste des figures

---

Figure 1 : Répartition des ADN paternels et maternels dans la descendance d'individus à reproduction sexuée ou asexuée. ....	22
Figure 2: Illustration du « two-fold cost of sex ». ....	25
Figure 3: Le cycle de vie de l'espèce <i>Daphnia magna</i> . ....	32
Figure 4: Comparaison des chromosomes holocentriques et monocentriques. ..	34
Figure 5: Organisation de la gonade chez <i>C. elegans</i> . ....	35
Figure 6: Mise en place de la cohésion des chromatides sœurs et des chromosomes homologues durant la méiose. ....	41
Figure 7: L'absence de la protéine HTP-1 entraine la disjonction des chromosomes homologues en diakinèse chez <i>C. elegans</i> . ....	43
Figure 8 : Représentation schématique de différents types de méiose. ....	47
Figure 9: Schéma explicatif de la fusion de gamètes. ....	49
Figure 10: Représentation schématique de la méiose avec endoréplication préméiotique. ....	50
Figure 11: La spermatogénèse chez <i>C. elegans</i> . ....	53
Figure 12: La compaction de l'ADN paternel se fait grâce aux protamines. ....	56
Figure 13: Modèle d'évolution du chromosome Y. ....	70
Figure 14: Le degré de différenciation des chromosomes sexuels varie grandement entre les espèces. ....	70
Figure 15: Représentation de la diversité des déterminismes du sexe parmi les animaux. ....	74
Figure 16: Comparaison de la ségrégation du chromosome X chez les mâles des espèces <i>C. elegans</i> et <i>A. rhodensis</i> . ....	77
Figure 17: Photographie d'un mâle et d'une femelle de l'espèce <i>Mesorhabditis belari</i> étudiée au cours de ma thèse. ....	81
Figure 18 : Observation des figures de méiose effectuées par Victor Nigon. ....	82
Figure 19: Le devenir des embryons selon Nigon. ....	85
Figure 20: Cycle de vie de <i>M. belari</i> JU2817. ....	101
Figure 21: Photographie de deux vers enroulés autour d'eux mêmes lors de la déprivation de nourriture. ....	102
Figure 22: Le pourcentage de mâles est corrélé au nombre d'embryons pondus par les mères. ....	105
Figure 23: Protocole de corisement entre des mâles vieux et des femelles jeunes. ....	106
Figure 24: l'âge des pères n'a pas d'influence sur le pourcentage de mâles mais sur le nombre de mâles dans la descendance. ....	108
Figure 25: La température a une faible incidence sur le pourcentage de mâles dans la descendance. ....	109
Figure 26: Les femelles produisent plus de mâles lorsqu'elles sont exposées à un changement de température au début du cycle reproductif. ....	110
Figure 27: L'ajout de phéromones entraine une baisse du pourcentage de mâles. ....	111
Figure 28: Un seul ou deux pronoyax peuvent être décondensés dans les embryons de <i>M. belari</i> . ....	113

Figure 29: Observation de devenir des embryons en fonction de leur développement.....	114
Figure 30: Les croisements entre frères et sœurs semblent produire une descendance plus souvent que des croisements effectués sans lien de parenté.....	149
Figure 31: Obtention des individus pour les croisements entre individus cousins et grand-cousins. ....	150
Figure 32: Les croisements entre frères et sœurs produisent plus souvent une progénie que ceux entre cousins ou grand-cousins. ....	151
Figure 33: Deux femelles ont été isolées à partir d'une même mère. ....	152
Figure 34: Les croisements entre individus frères et sœurs produisent plus de mâles en proportion dans la descendance. ....	153
Figure 35: Les croisements entre individus frères et sœurs produisent plus de mâles en proportion dans la descendance. ....	155
Figure 36 : Marquage du parasite Wolbachia à l'iodure de propidium dans les gonades de mâle et de femelle de <i>M. belari</i> .....	167
Figure 37: Les deux types d'embryons observés chez <i>M. belari</i> sont diploïdes. ....	170
Figure 38: Observation de spermatides en DIC et Hoechst. ....	172
Figure 39: Modifications épigénétiques au stade pachytène.....	173
Figure 40: PCR effectuées sur les contigs et les gènes avec une couverture différente entre les mâles et les femelles.....	176
Figure 41: Les gènes présents uniquement chez les mâles sont aussi présents chez les femelles mais en plus faible quantité.....	179
Figure 42: Marquage du complexe de protéines MSP sur des gonades de mâles écrasées. ....	180
Figure 43: Schéma explicatif des types de ségrégation possibles du facteur paternel chez <i>M. belari</i> . ....	186
Figure 44: Organisation de la gonade femelle de <i>M. belari</i> . ....	189
Figure 45: Marquage de l'ADN dans des gonades de femelles de la souche JU2817.....	190
Figure 46: Observation du nombre de chromosomes présents sur la plaque métaphasique en métaphase de méiose 1.....	193
Figure 47: Schéma explicatif des figures de méiose observées chez <i>M. belari</i> ....	195
Figure 48: Schéma explicatif du type de division méiotique dans les embryons amphimixiques et gynogénétiques.....	196
Figure 49: Explication de la répartition des sites hétérozygotes dans la descendance femelle de la souche JU2865.....	198
Figure 50: Marquage de Mab414 dans les deux types d'embryons de <i>M. belari</i> . ....	206
Figure 51: Marquage de l'ADN et de la tubuline dans les deux types d'embryons de <i>M. belari</i> . ....	206
Figure 52: Arbre phylogénétique du genre <i>Mesorhabditis</i> .....	210
Figure 53: Observation du nombre de chromosomes chez <i>M. longespiculosa</i> DF5017. ....	212
Figure 54: Marquage des chromosomes de différentes souches pseudogames avant la première division de méiose.....	213
Figure 55: Observation des chromosomes dans l'ovocyte avant fécondation chez <i>M. spiculigera</i> JU2865. ....	213

Figure 56: Comparaison des gonades de souches gonochoriques et pseudogames de <i>Mesorhabditis</i> .....	215
Figure 57: Comparaison des embryons produits par <i>M. longespiculosa</i> et <i>M. belari</i> .....	217
Figure 58: Comparaison des embryons produits par <i>M. longespiculosa</i> et <i>M. belari</i> .....	218
Figure 59: Sex ratio observés chez différentes espèces de <i>Mesorhabditis</i> pseudogames.....	220

# Introduction

---

Mon projet de thèse consistait à reprendre la caractérisation cellulaire du nématode *Mesorhabditis belari* initialement décrit en 1949 par V. Nigon (Nigon, 1949). Cette espèce était décrite comme ayant un mode de reproduction pseudogame où la plupart des embryons fécondés n'utilisaient pas l'ADN paternel pour leur développement. Une petite partie de ces embryons fécondés subissait cependant un développement classique, pour donner en partie naissance à des mâles. Chez cette espèce, les processus cellulaires tels que la méiose de l'ovocyte et le devenir de l'ADN paternel après fécondation ainsi que les mécanismes de déterminisme du sexe étant atypiques, j'ai choisi de les explorer à nouveau. Ce faisant, nous avons découvert un mode de reproduction tout à fait remarquable et nouveau. Pour replacer mes travaux dans leur contexte, mon introduction comportera plusieurs parties distinctes qui sont la description des mécanismes de reproduction sexués et asexués, celle des processus de méiose et de gamétogénèse ainsi que celle du déterminisme du sexe chez les animaux. Pour finir, je détaillerai les travaux et les conclusions obtenus par V. Nigon et ses prédécesseurs, avant de présenter mes propres résultats.

## **1. La reproduction, un mécanisme fondamental pour la perpétuation de l'espèce**

La reproduction est le processus nécessaire à la perpétuation de toutes les espèces vivantes. Elle permet la production de nouveaux individus à partir d'individus parents. Ce processus fondamental est partagé par tous les domaines du vivant, eucaryotes et procaryotes. Bien que la reproduction soit indispensable au maintien de l'espèce, de nombreux types de reproduction différents existent.

Les différents types de reproduction peuvent être classés selon deux grandes catégories, même s'il est parfois compliqué d'en classer certains : la reproduction

sexuée et la reproduction asexuée. La définition de la reproduction sexuée peut varier mais elle est généralement définie comme nécessitant deux parents produisant un type de gamète chacun. La fusion de ces gamètes contenant chacun du matériel génétique entraîne la formation d'un nouvel individu qui lui-même transmettra le génome de ses deux parents à sa descendance (Hartfield and Keightley, 2012). La reproduction asexuée est quant à elle généralement définie par le fait que les individus asexués ne s'engageront pas régulièrement dans un cycle sexué et produiront des individus sans partenaire sexuel (Pigneur et al., 2012).

Il est admis que les premiers organismes se reproduisaient de manière sexuée, la reproduction asexuée serait donc dérivée de la reproduction sexuée (Schwander and Crespi, 2009).

### **1.1 La reproduction sexuée**

La reproduction sexuée est caractérisée par la présence de plusieurs sexes dans l'espèce, ceux-ci produisant des gamètes différents qui se rencontreront lors de la fécondation pour assurer le développement d'un nouvel organisme (Figure 1 « reproduction sexuée »). Chez les individus diploïdes à reproduction sexuée, il est nécessaire de produire des gamètes haploïdes afin de restaurer la diploïdie lors de la fécondation. Ce processus est assuré par la méiose, mécanisme cellulaire permettant la ségrégation des chromosomes et l'exclusion de la moitié du matériel génétique pour produire les cellules qui deviendront les gamètes. La fusion de ces gamètes, appelée syngamie, ainsi que le mélange de l'ADN qu'ils contiennent, appelé amphimixie, sont nécessaires au développement du futur individu.

Les espèces sexuées peuvent être gonochoriques ou hermaphrodites. Les espèces gonochoriques sont composées d'individus au sexe distinct. Les femelles produisent les ovocytes alors que les mâles produisent les spermatozoïdes. Les espèces hermaphrodites sont composées d'individus présentant les deux types d'organes sexuels mâle et femelle. Chez les escargots, l'échange de sperme se produit entre deux individus qui stockeront les spermatozoïdes pour féconder leurs ovocytes (Geraerts, 1976) On peut distinguer les espèces hermaphrodites



simultanées qui se reproduisent via l'échange de sperme entre individus des espèces hermaphrodites auto fécondantes comme le nématode *C. elegans* qui fécondent leur ovocytes avec leurs propres spermatozoïdes (Huelgas-Morales and Greenstein, 2017)

## **1.2 La reproduction asexuée**

Chez les espèces asexuées, un seul parent est généralement responsable de la transmission de son génome à sa descendance. Il existe plusieurs types de reproduction asexuée, certains nécessitant la production de gamètes grâce à la méiose et d'autres ne faisant intervenir que la mitose. De nombreuses espèces ont été décrites comme asexuées, incluant certaines espèces de vertébrés comme les reptiles ou les amphibiens (Dawley, 1989; Neaves and Baumann, 2011; Vrijenhoek et al., 1989). Chez les espèces asexuées un seul parent est responsable de la production des zygotes. On trouve donc, chez ces espèces, des mécanismes méiotiques leur permettant de maintenir la diploïdie pour leur future descendance, ou bien de maintenir une descendance viable à l'état haploïde.

### **1.2.1 La parthénogénèse**

La parthénogénèse, du grec parthénos : vierge, et genesis : naissance, est un mode de reproduction pour lequel les femelles produisent de nouveaux individus sans gamète mâle (Figure 1 « Parthénogénèse »). Les femelles parthénogénétiques sont capables de produire des ovocytes qui donneront un zygote sans fécondation. Plusieurs types de parthénogénèse existent :

- La parthénogénèse obligatoire, pour laquelle les espèces ne sont composées que de femelles qui se reproduisent sans mâles. C'est par exemple le cas de la crevette *Artemia parthenogenetica* (Amat et al., 2005), et les rotifères de la classe Bdelloida (King et al., 2005). Chez les vertébrés, seules quelques espèces de lézards du genre *Apidoscelis* sont composées uniquement de femelles produisant une descendance par parthénogénèse (Lutes et al., 2010).

- La parthénogénèse cyclique, pour laquelle la plupart du temps les femelles produiront des femelles, puis, lorsque les conditions environnementales se dégradent, elles produisent alors des mâles capables de produire des œufs résistants via la reproduction sexuée (Hebert, 1987). C'est le cas d'espèces comme *Daphnia pulex* (Hebert et al., 1988), ou des rotifères de la classe Monogononta (King et al., 2005).

- La parthénogénèse facultative, pour laquelle les espèces sont normalement sexuées, composées de mâles et de femelles, mais en l'absence de mâles, une femelle pourra produire seule des filles par parthénogénèse. Ce cas a été observé chez plusieurs espèces de vertébrés comme les requins (Chapman et al., 2007) (Chapman et al., 2008) ou les serpents (Germano and Smith, 2010).

De plus, certaines espèces peuvent produire des individus d'un sexe via la parthénogénèse, et de l'autre sexe via la reproduction sexuée. Chez les hyménoptères, les femelles sont diploïdes et les mâles haploïdes. La fécondation des ovules engendre des individus femelles, tandis que l'absence de fécondation des ovules entraîne le développement du zygote en mâle (Bourke, A. F. G. and Franks, N. R. 1995., 1995). L'espèce comprend donc des mâles et des femelles mais la fécondation n'est pas nécessaire pour produire un des deux sexes. Ici, les mâles sont produits par parthénogénèse dite arrhénotoque.

### 1.2.2 Les parasites sexuels

Le parasitisme sexuel fait référence à plusieurs types de reproduction qui sont : l'androgénèse, la gynogénèse et l'hybridogénèse. Ces types de reproduction, qui seront détaillés par la suite, sont caractérisés par le fait qu'un des parents, bien qu'il fournisse un gamète, ne transmettra pas ses gènes à la future génération ou aux générations suivantes. Ainsi, certains individus fourniront un investissement pour produire des gamètes, mais ceci n'assurera pas la transmission de leurs gènes dans la population. Les mécanismes d'élimination d'un des génomes parentaux ne sont pas connus. Le parasitisme sexuel a été observé aussi bien chez les plantes que chez les animaux, chez des espèces gonochoriques et hermaphrodites. De plus, aussi bien des mâles que des femelles peuvent être parasites, même si peu d'espèces

pour lesquelles les mâles sont les parasites ont été observées jusqu'alors (Lehtonen et al., 2013).

Le parasitisme sexuel peut intervenir au sein d'une même espèce, comme chez l'espèce hermaphrodite de ver plat *Schmidtea polychroa* (D'Souza and Michiels, 2009), ou bien entre différentes espèces comme chez le poisson *Poecilia formosa* (Grebelyni, 2009). Dans ce dernier cas, l'espèce parasite sera composée uniquement de mâles ou de femelles, qui utiliseront les gamètes des individus de l'autre sexe provenant d'une espèce hôte sexuée. Pour la plupart des espèces parasites, l'origine de ce mode de reproduction est certainement due à des événements d'hybridation entre deux espèces (Bullini, 1994; Schlupp, 2005). Il est en effet possible de produire artificiellement des individus présentant un parasitisme sexuel grâce à des croisements entre des individus provenant d'espèces différentes et considérées comme apparentées à des espèces parasites déjà connues (Choleva et al., 2012).

#### 1.2.2.1 L'androgénèse

L'androgénèse est un type de reproduction pour lequel seul le matériel génétique paternel est transmis au futur zygote (Figure 1 « Androgénèse »). Peu de cas d'androgénèse ont été observés, cependant, ce type de reproduction est retrouvé chez différentes espèces comme chez les mollusques ou les fourmis (McKone and Halpern, 2003; Schwander and Oldroyd, 2016).

La plupart du temps, les ovocytes seront produits sans ADN maternel, le zygote se développera donc seulement avec l'ADN provenant de son père. Comme chez l'espèce de cyprès *Cupressus dupreziana* (Pichot et al., 2000). Dans ce cas tous les nouveaux individus produits devraient être des mâles. L'espèce ne comprendrait alors plus de femelles et serait vouée à l'extinction (McKone and Halpern, 2003). Les mécanismes permettant le maintien de la production d'ovocytes chez ces espèces ne sont pas bien connus. Une hypothèse existe, proposant que ces individus soient capables de féconder les ovocytes des femelles d'autres espèces, et d'éliminer le génome maternel une fois la fécondation produite (Pichot et al., 2001).

Chez quelques espèces, le zygote est formé avec l'ADN maternel et paternel, puis l'ADN maternel sera éliminé plus tard lors du développement. Si les mâles sont diploïdes, ils devront produire des gamètes diploïdes, par duplication de génome ou par fusion de deux spermatozoïdes haploïdes, c'est le cas des espèces du genre de mollusques *Corbicula* (Komaru et al., 2000) ((Ishibashi et al., 2003). Ce mode de reproduction ne serait pas apparu suite à des événements d'hybridation entre espèces mais de manière spontanée au sein de l'espèce.

De plus, certaines espèces ne produisent que des spermatozoïdes haploïdes sans restaurer la diploïdie avant la fécondation. Dans ce cas, deux spermatozoïdes haploïdes fusionneront avec un seul ovocyte (Mantovani and Scali, 1992). Si les mâles de ces espèces sont hétérogamétiques, ils sont alors capables de produire à la fois des femelles et des mâles à la suite de l'androgénèse, permettant ainsi de maintenir un pool de femelles qui produiront des ovocytes à la prochaine génération.

Ces espèces peuvent avoir un système haplo-diploïde, auquel cas les mâles produiront des spermatozoïdes haploïdes, et l'absence d'un autre noyau entrainera le développement d'un zygote haploïde, et donc mâle, comme observé chez la fourmi *Wasmannia auropunctata* (Fournier et al., 2005). L'ADN maternel est éliminé après la fécondation. Les spermatozoïdes ayant subi la méiose sont haploïdes, et la présence d'un seul génome chez le zygote entraîne son développement en mâle. Chez cette espèce, les femelles sont aussi capables de produire des femelles par parthénogénèse thélytoque. Les mâles et les femelles possèdent donc deux génomes qui divergeront l'un de l'autre puisqu'ils ne sont pas en présence l'un de l'autre ni chez les femelles, ni chez les mâles. Les femelles héritent du génome de leur mère uniquement, et les mâles du génome de leur père uniquement, et ce, à chaque génération.

#### 1.2.2.2 **La gynogénèse**

Au contraire de l'androgénèse, la gynogénèse est un type de reproduction pour lequel les femelles produisent des descendants ne portant que leur matériel

génétique (Figure 1 « Gynogénèse »). Pour ce faire, les femelles produisent des ovocytes qui doivent être fécondés par un spermatozoïde, mais dont l'ADN sera éliminé après la fécondation. Ce type de reproduction est aussi appelé pseudogamie ou « sperm-dependent parthenogenesis ». En effet, les femelles se reproduiront de manière clonale, mais nécessiteront tout de même le stimulus d'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte pour déclencher la suite du développement embryonnaire (Beukeboom and Vrijenhoek, 1998).

Ce type de reproduction a été étudié chez de nombreuses espèces, l'exemple le plus connu est celui de l'espèce des molly d'Amazone *Poecilia formosa* qui fait partie d'un complexe de reproduction avec d'autres poissons du genre *Poecilia* (Schlupp, 2010). *Poecilia formosa* est une espèce composée uniquement de femelles qui a émergé il y a approximativement 80 000 ans via l'hybridation de deux espèces sexuées connues *P. mexicana* et *P. latipinna* (Loewe and Lamatsch, 2008).

*P. formosa* peut utiliser les spermatozoïdes de ces deux espèces pour activer ses ovocytes, mais elle est aussi capable d'utiliser les spermatozoïdes d'une autre espèce qui est *P. latipunctata* (Niemeitz et al., 2002) (Schlupp et al., 2002). Après la fécondation, l'ADN paternel n'est pas intégré au génome du zygote, cependant, les mécanismes d'exclusion de l'ADN paternel sont inconnus.

Chez cette espèce, deux formes de « fuite » paternelle ont été observées, d'une part la rétention de tous les chromosomes paternels dans l'embryon, d'autre part des minichromosomes surnuméraires (Lampert and Schartl, 2010; Schlupp et al., 1998). Ces « fuites » sont certainement dues à un échec d'élimination du génome paternel. Cependant ce phénomène n'engendre pas de masculinisation des individus, qui malgré l'intégration d'une partie ou de tous les chromosomes paternels, resteront des femelles. Il est considéré que ces « fuites » peuvent potentiellement assurer un meilleur succès reproductif et une longévité plus longue de l'espèce en apportant de la diversité génétique (Loewe and Lamatsch, 2008).

Ces « fuites » ne sont pas observées seulement chez *P. formosa*, mais aussi chez d'autres espèces de poissons gynogénétiques comme chez l'espèce *Fundulus diaphanus-heteroclitus* (Dawley, 1992).

Un cas semble se détacher des observations faites en général chez les espèces de poissons gynogénétiques. C'est celui de l'espèce *Carassius gibelio*, chez

cette espèce, les femelles sont capables de produire des mâles qui représentent environ 20% de la population (Abramenko, 1998). Lorsque les femelles sont fécondées par un mâle d'une autre espèce, l'ADN paternel sera immédiatement éliminé après fécondation, ce qui donne naissance à une descendance uniquement composée de femelles. Cependant, si les femelles sont fécondées par un mâle de la même espèce, alors l'ADN paternel sera retenu et se décondensera, puis une partie de l'ADN maternel sera éliminé. Dans ce cas, des mâles et des femelles sont produits, cette forme de gynogénèse est appelée « allogynogénèse » (Jiang et al., 1983).

### **1.2.2.3 L'hybridogénèse**

Une autre forme de parasitisme sexuel semblable à la gynogénèse et à l'androgénèse est l'hybridogénèse. Dans ce cas particulier, l'élimination du génome d'un des parents ne se fait pas immédiatement après la fécondation (Figure 1 « hybridogénèse »). Les ADN paternels et maternels participent au génome du zygote mais les individus de cette descendance élimineront systématiquement l'ADN paternel (pour les femelles) et l'ADN maternel (pour les mâles) lors de la méiose qui produit leur gamètes. Durant cette méiose, les chromosomes paternels et maternels ne recombineront pas et un des lots de chromosomes sera éliminé des cellules germinales. Le génome des pères ne sera donc exprimé que dans les cellules somatiques de leurs filles avant d'être éliminé à la génération suivante. Seul l'ADN maternel sera alors transmis (et inversement pour les mâles) (Lamatsch and Stöck, 2009; Schmidt et al., 2011; Vorburger et al., 2009).

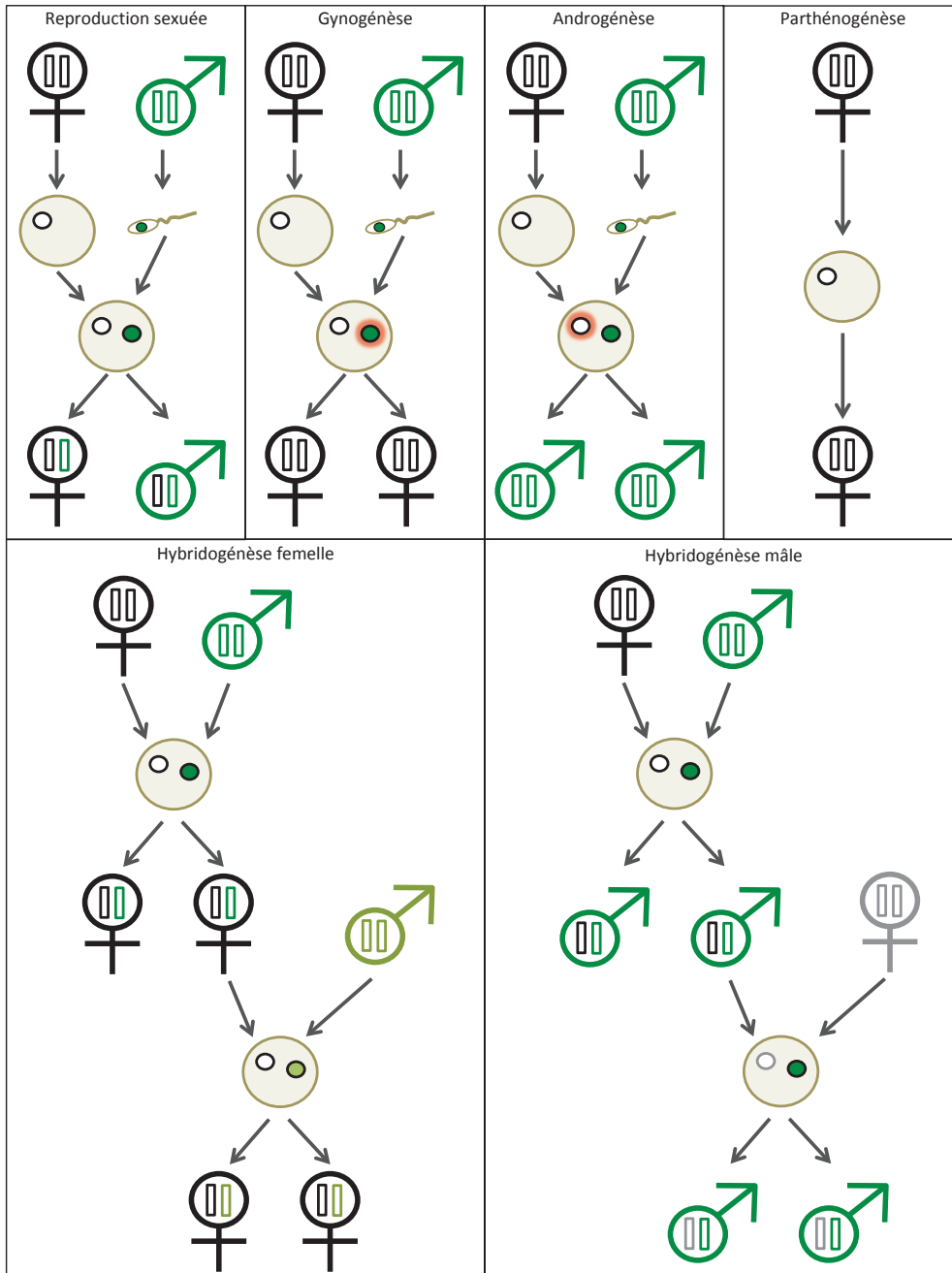


Figure 1 : Répartition des ADN paternels et maternels dans la descendance d'individus à reproduction sexuée ou asexuée.

Les femelles ainsi que leur ADN sont représentés en noir, les mâles ainsi que leur ADN en vert. La fécondation est indiquée par la présence du pronoyau mâle (vert) dans l'ovocyte. Les pronoyaux auréolés de rouge seront éliminés du zygote après la fécondation. Les mécanismes d'élimination ne sont pas connus. Chez les espèces hybridogènes, le pronoyau n'est pas éliminé après la fécondation, il est présent dans la descendance directe puis est éliminé lors de la gamétogénèse de cette descendance.

### 1.3 Maintien des parasites sexuels

Plusieurs études ont été menées afin de comprendre comment de telles espèces pouvaient se maintenir (Kokko and Heubel, 2011; McKone and Halpern, 2003; Tinti and Scali, 1996). En effet, le choix des mâles de l'espèce hôte pour des femelles gynogénétiques plutôt que des femelles de leur propre espèce semble contre-intuitif. Les mâles, en se reproduisant avec des femelles gynogénétiques ou hybridogénétiques investissent dans un comportement reproductif qui ne leur assure pas de descendance portant leur génome. Ce type de reproduction ne leur apporte donc pas d'avantage du point de vue de leur succès reproducteur (= fitness). Cependant, les femelles gynogénétiques semblent présenter les mêmes critères morphologiques que les femelles de l'espèce hôte, il est donc considéré que les mâles auraient tendance à continuer de s'accoupler avec des femelles gynogénétiques pour ne pas perdre d'occasion de s'accoupler face à une femelle potentiellement conspécifique (Schmeller, 2005). De plus, il a été montré que des mâles de l'espèce hôte préfèrent s'accoupler avec des femelles gynogénétiques réceptives plutôt qu'avec des femelles conspécifiques non réceptives (Schlupp et al., 1991). Ce comportement est à mettre en lien avec le phénomène d'anisogamie qui permet aux mâles de produire plus de spermatozoïdes que les femelles ne peuvent produire d'ovules. Ce phénomène entraîne donc une baisse de l'intérêt porté par les mâles pour le choix de leur partenaire puisqu'ils sont capables de se reproduire avec plusieurs femelles et de ne pas perdre trop d'énergie à se reproduire avec une femelle gynogénétique (Andersson, 1994).

Il a par ailleurs été montré que les mâles des espèces de poissons, amphibiens et reptiles préfèrent s'accoupler avec des femelles de grande taille qu'avec des femelles de petite taille (Berven, 1981; Pélabon et al., 2003; Shine et al., 1996). La grande taille des femelles révèle une plus grande taille des ovocytes produits et une survie des embryons plus importante (Räsänen et al., 2002). C'est par exemple le cas chez les mâles de l'espèce *Rana lessonae* qui préfère s'accoupler de manière hybridogène avec des femelles plus larges de l'espèce *Rana ridibunda* qu'avec les femelles plus petites de leur propre espèce (Blankenhorn, 1977; Lada et al., 2011). Ce choix a aussi été observé chez les mâles des espèces *P. mexicana* et *P. latipinna* qui préfère s'accoupler avec les femelles de l'espèce *P. formosa* bien qu'elles soient gynogénétiques. De plus il a été montré que les femelles de l'espèce *P. latipinna*



auront tendance à préférer des mâles qu'elles ont vu s'accoupler avec des femelles de l'espèce *P. formosa* plutôt que des mâles qu'elles n'ont pas vu s'accoupler avec d'autres femelles, même gynogénétiques (Schlupp et al., 1994). Il semblerait donc que les mâles peuvent maximiser leur chance de s'accoupler avec une femelle conspécifique s'ils ne sélectionnent pas les femelles avec lesquelles ils s'accouplent.

#### **1.4 Avantages et désavantages du sexe**

Une des plus importantes questions de la biologie de l'évolution est de comprendre le maintien de la reproduction sexuée chez la plupart des organismes multicellulaires. En effet, la reproduction sexuée est considérée comme coûteuse, ce que John Maynard Smith a nommé «the two-fold cost of sex» (Maynard Smith, 1971, 1978). D'une part, la croissance d'une population asexuée devrait être deux fois plus importante que celle d'une population sexuée à chaque génération. En effet, si une population sexuée est composée de  $n$  individus (50% de mâles et 50% de femelles) et que ces individus se reproduisent tous une fois, ils produiront  $n/2$  individus à la génération suivante (1 mâle et 1 femelle nécessaire pour produire 1 individu). En revanche, une espèce asexuée composée de  $n$  individus se reproduisant une fois produirait  $n$  individus à la génération suivante (1 femelle produit 1 femelle) (Figure 2). D'autre part, des individus sexués subissent une dilution de leur génome via la reproduction puisqu'ils ne transmettent que la moitié de leur génome à leur descendance tandis que des individus asexués peuvent lui en transmettre l'intégralité.

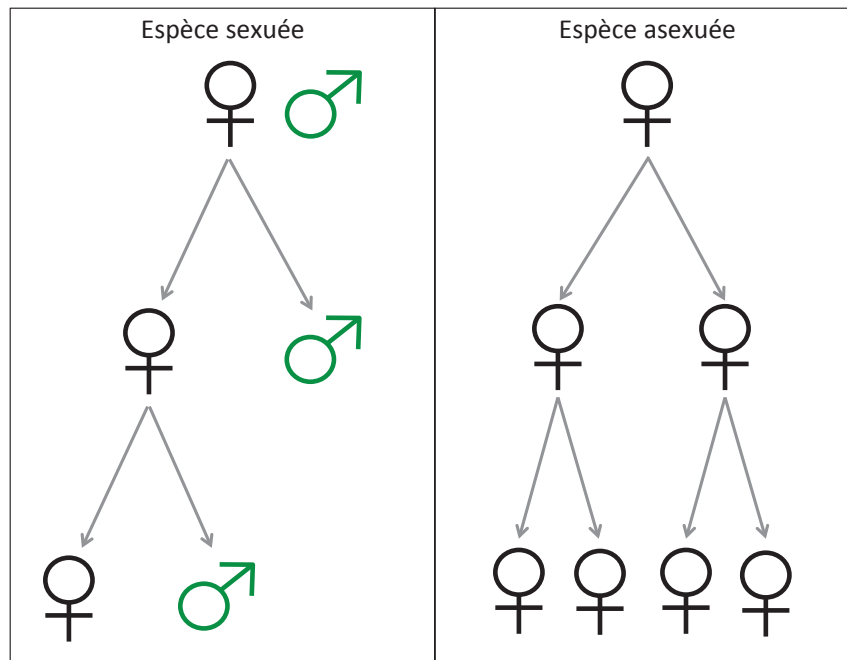


Figure 2: Illustration du « two-fold cost of sex ».

Seules les femelles sont capables de produire une nouvelle descendance, cette illustration se base sur la production de deux descendants par femelle dans les espèces sexuées et asexuées. Dans une espèce sexuée, un mâle et une femelle sont requis pour produire une descendance, la moitié de cette descendance sera composé de mâles et l'autre moitié de femelles. Dans une espèce asexuée, une femelle est capable de produire deux descendants qui seront uniquement des femelles, elles-même capables de produire deux descendants femelles chacune. A la troisième génération, le nombre d'individus dans l'espèce asexuée dépasse le nombre d'individus de l'espèce sexuée.

De plus la reproduction sexuée, via la méiose, entraîne la séparation de combinaisons de gènes efficaces dans l'environnement où elles sont exposées. La méiose peut aussi être considérée comme un processus demandant beaucoup de temps et pouvant commettre des erreurs (Lewis, 1987). Au contraire, la reproduction asexuée permet aux individus, en se reproduisant de façon clonale, de transmettre plus efficacement des combinaisons de gènes avantageuses, (Lloyd, 1979) de ne pas dépenser d'énergie à produire des mâles, et de coloniser plus rapidement un habitat.

La reproduction sexuée entraîne aussi plusieurs coûts en temps et en énergie qui sont : la recherche d'un partenaire, l'exposition aux prédateurs pendant l'accouplement et le fait que cet accouplement puisse être néfaste pour les femelles (Arnqvist G, 2005). Les femelles d'espèces gynogénétiques sont également exposées à ce genre de coût, même si elles économisent le coût lié à la production des mâles.

Il semble donc que, si des femelles asexuées apparaissent dans une population sexuée, elles seraient capables de remplacer rapidement les individus de l'espèce sexuée, en produisant rapidement un plus grand nombre de descendants qui leur ressemblent et en économisant le coût lié à la production des mâles et à l'accouplement.

Plusieurs théories ont émergé, permettant d'expliquer pourquoi la reproduction sexuée serait malgré tout maintenue, et resterait le mode de reproduction le plus répandu. Ces hypothèses sont basées sur le phénomène de recombinaison des chromosomes pendant la formation des gamètes, qui permet de créer un nouvel individu différent génétiquement de ses parents, et donc d'apporter de la diversité génétique au sein de la population. Premièrement, la recombinaison apporte une diversité qui permet de s'adapter plus facilement face à des espèces parasites, qui elles-mêmes évoluent rapidement. C'est la théorie de « La Reine Rouge » (Jaenike, 1978; Salathé et al., 2008). Deuxièmement, la recombinaison permet d'éliminer plus facilement des mutations délétères lorsqu'elles sont en présence l'une de l'autre (effet d'épistasie négative) (Kondrashov, 1988; Kouyos et al., 2007). Troisièmement, elle permet d'augmenter le nombre de combinaisons de gènes qui seront exposés à la sélection. Ainsi, en comparaison, les espèces asexuées accumuleraient des mutations délétères, et de l'homozygotie entraînant l'expression de mutations récessives tout en perdant la possibilité de s'adapter aux changements environnementaux. Ceci implique que les espèces asexuées ne devraient pas survivre sur le long terme.

Une autre explication possible pour le maintien de la reproduction sexuée est que la reproduction asexuée, bien qu'apportant des avantages certains à courts termes, entraîne des coûts importants sur le long terme. Ainsi, les espèces seront confrontées à une dépression de consanguinité de part leur reproduction clonale (Archetti, 2004; D Charlesworth and Charlesworth, 1987). Cette reproduction entraîne en effet une perte d'hétérozygotie et ceci freinerait leur adaptation face à de possibles changements environnementaux pour deux raisons. La première étant l'expression de mutations récessives et la deuxième la perte d'hétérozygotie lorsque celle-ci apporte un avantage. De plus, ces espèces ne seraient pas capables

d'éliminer des mutations délétères, et seraient voués à l'extinction due à l'accumulation de ces mutations (effet nommé Muller's ratchet) (Felsenstein, 1974).

Cette hypothèse que la reproduction asexuée serait une voie sans issue et que les espèces asexuées seraient vouées à l'extinction rapidement (Goldberg et al., 2010b) semble corroborée par le fait que les espèces asexuées soient peu nombreuses et retrouvées à l'extrémité des arbres phylogénétiques, impliquant que les espèces asexuées connues à ce jour soient seulement de jeunes espèces (Bell, 1982).

Cependant, plusieurs études ont permis de révéler que certaines espèces asexuées étaient extrêmement vieilles, et dépassaient parfois la limite de viabilité que prédisent les modèles théoriques (Neiman et al., 2009). C'est par exemple le cas de l'espèce *Atremia parthenogenetica* dont l'âge est estimé à 3 millions d'années ou l'espèce de crustacé *Eucypris virens* dont l'âge maximum est estimé à 5,5 millions d'années (Baxevanis et al., 2006; Schön et al., 2000). D'autres études ont montré que ces espèces possédaient de nombreux moyens pour maintenir une variabilité génétique de manière indépendante du sexe. C'est par exemple le cas des rotifères où des transferts horizontaux de matériel génétique ont été observés (Butlin, 2002; Schwander and Crespi, 2009).

Certaines études ont cherché à comparer la fitness d'espèces sexuées et asexuées. Ces études sont difficiles à mettre en place, mais aussi à comparer les unes aux autres puisque les espèces sélectionnées pour les différentes études ne sont pas aussi distantes évolutivement les unes des autres, et ne partagent pas toujours le même type d'environnement. Plusieurs études ont montré que les individus asexués produisaient une descendance avec une plus forte mortalité ou une plus faible fécondité que celle des espèces sexuées. Certaines études ont montré que lorsque les espèces étaient mises en compétition, les espèces sexuées étaient plus performantes que les espèces asexuées, mais d'autres études ont montré le contraire (Browne and Halanych, 1989; Goddard et al., 2005; Greig et al., 1998)

Il semblerait donc que ces deux types de reproduction présentent chacun des avantages et des inconvénients et que le fait que peu d'espèces présentent une reproduction asexuée soit du aux nombreuses contraintes génétiques et cellulaires

que requiert l'émergence d'un tel type de reproduction à partir d'une reproduction sexuée.

## **1.5 Contraintes génétiques et cellulaires pour l'émergence de la reproduction asexuée**

Dans ce chapitre j'aborderai les contraintes nécessaires à l'émergence d'une parthénogénèse obligatoire. Cependant, certaines contraintes s'appliquent aussi à l'émergence des autres types de reproduction asexuée que nous avons abordés.

### **1.5.1 Le maintien de la ploïdie**

La méiose est un processus qui permet de diminuer le nombre de chromosomes présents dans l'ovocyte afin de rétablir la ploïdie correcte via la fécondation. La méiose des femelles parthénogénétiques doit donc être modifiée afin de maintenir la ploïdie dans l'ovocyte. Plusieurs méioses alternatives existent au sein des espèces asexuées, elles seront détaillées dans le chapitre « 2. La méiose ». Ces méioses alternatives impliquent des mécanismes cellulaires complexes tels que le changement des mécanismes de ségrégation des chromosomes, ou la réintégration d'un produit de méiose normalement éliminé définitivement de l'ovocyte. Selon le type de méiose alternative employé, les niveaux d'hétérozygotie ne seront pas les mêmes dans la descendance. Ainsi, certains types de méiose alternative entraîneront une homozygotie complète tandis que d'autres permettront de maintenir l'hétérozygotie chez les descendants.

### **1.5.2 L'activation des ovocytes**

Chez la plupart des espèces, les ovocytes sont maintenus à un stade spécifique durant ou après la méiose, c'est l'entrée du spermatozoïde qui déclenche la suite du développement embryonnaire. Cette activation est déclenchée par des modulations dans la concentration calcique (Stricker, 1999). Chez certaines espèces

gonochoriques comme *Drosophila melanogaster*, l'accouplement déclenche l'ovulation qui entraîne l'activation des ovocytes. Cette activation est donc indépendante de l'entrée du spermatozoïde (Lung et al., 2002). Chez les femelles du genre *Xenopus*, il est par exemple possible d'activer le début du développement embryonnaire, comme l'aurait fait l'entrée d'un spermatozoïde, grâce à un stimulus mécanique. Cependant, l'arrêt du développement embryonnaire suit rapidement cette activation. Chez les espèces parthénogénétiques, l'activation des ovocytes doit obligatoirement se faire indépendamment de l'entrée d'un spermatozoïde.

### 1.5.3 Les centrosomes

Les centrosomes sont responsables de la formation du fuseau mitotique permettant la séparation des chromosomes durant la mitose ainsi que de la polarisation de l'embryon chez certaines espèces comme *C. elegans* ou le Xénope (Marshall, 2001). Chez la plupart des espèces, les centrioles sont apportés par les spermatozoïdes, les centrioles maternels étant inactifs dans l'ovocyte ou détruit durant la gamétogénèse (Delattre and Gönczy, 2004; Manandhar et al., 2005). Sans ces centrioles, il n'est pas possible d'assembler un centrosome et donc de poursuivre le développement embryonnaire. Chez les femelles du genre *Xenopus*, la stimulation mécanique entraîne la reprise du développement embryonnaire mais celui-ci est avorté à la première mitose. Cependant, l'ajout de centrioles permet de continuer cette première division, démontrant l'importance des centrioles paternels à la fécondation (Maller et al., 1976).

Chez les espèces parthénogénétiques, des mécanismes permettant soit, de ne pas dégrader les centrioles après l'ovogénèse soit, de les synthétiser *de novo* après les avoir dégradés sont donc nécessaires. Chez certaines espèces comme les rongeurs ou certains insectes, ni le spermatozoïde ni l'ovule n'apportent les centrioles, les centrosomes sont alors assemblés *de novo* dans le cytoplasme de l'ovocyte (Marescalchi et al., 2002; Schatten et al., 1986). L'indépendance du développement zygotique vis-à-vis des centrioles paternels pourrait avoir été

favorable à l'émergence de nombreuses espèces aséxuées chez les insectes (Manandhar et al., 2005).

Chez *C. elegans*, le point d'entrée du spermatozoïde définit le côté postérieur du futur animal grâce à la mise en place d'une cascade de signalisation à partir des centrioles paternels (Goldstein and Hird, 1996). A la fécondation, un flux cytoplasmique orienté vers le spermatozoïde permettra la réorganisation des protéines cytoplasmiques et corticales en deux domaines antérieur et postérieur. Dans d'autres espèces de nématode de la famille des Cephalobina, les embryons sont également polarisés. Cependant, la position de la cellule postérieure n'est pas corréllée à la position du point d'entrée du spermatozoïde, et aucun flux cytoplasmique orienté n'est observé. Ainsi, la polarisation des embryons est indépendante de l'entrée du spermatozoïde dans cette famille (Goldstein et al., 1998). L'existence de nombreuses espèces parthénogénétiques dans cette famille suggère que l'affranchissement du spermatozoïde comme élément polarisateur de l'embryon dans cette famille aurait pu faciliter l'émergence de la parthénogénèse.

#### 1.5.4 Contraintes spécifiques à certaines espèces

##### 1.5.4.1 L'empreinte génomique et les facteurs paternels

Chez les mammifères, l'empreinte génomique permet une expression différente des gènes, selon qu'ils soient présents sur le génome maternel ou paternel. Cette empreinte permet qu'un seul des allèles (paternel ou maternel) ne soit exprimé. L'absence de génome paternel chez les mammifères entraîne donc la surexpression de certains loci ainsi que le manque d'expression d'autres loci dans l'embryon en développement (Wood and Oakey, 2006). Plusieurs expériences ont été menées chez les souris pour comprendre l'effet de cette empreinte sur le développement embryonnaire. Il a notamment été montré que l'absence d'empreinte génomique paternelle entraîne la mort des embryons au bout de 10 jours de gestation (Surani and Barton, 1983). Cette nécessité de posséder deux

génomés ayant subi un dépôt d'empreinte différent selon le parent dont ils proviennent constituerait donc une barrière pour l'apparition de la parthénogénèse chez les mammifères (Kono, 2006).

Par ailleurs, certains facteurs apportés uniquement par le spermatozoïde sont nécessaires au développement du zygote, ces facteurs sont appelés facteurs paternels. Seuls quelques facteurs paternels sont connus à ce jour. Chez *C. elegans*, la protéine SPE-11, apportée par les spermatozoïdes, est nécessaire pour que l'ovocyte termine sa méiose et que l'embryon forme sa coquille, mais sa fonction reste inconnue. (Browning and Strome, 1996; Hill et al., 1989). Chez *Drosophila melanogaster*, la protéine K81, responsable du capping des télomères, est apportée par le spermatozoïde et son absence entraîne la mortalité embryonnaire (Yasuda et al., 1995). Les facteurs paternels constituent donc une contrainte pour l'affranchissement des spermatozoïdes et donc de l'apparition d'un mode de reproduction asexué.

#### **1.5.4.2 La production d'œufs résistants**

Certaines espèces de pucerons et de Daphnies sont des parthénogénétiques cycliques. Les femelles sont capables de produire à la fois des femelles et des mâles par parthénogénèse qui seront eux-mêmes capables d'avoir une reproduction sexuée. Cependant, les femelles parthénogénétiques ne produisent que des mâles quand les conditions environnementales le nécessitent. De plus, les œufs produits par les femelles parthénogénétiques ne sont pas résistants à certaines conditions que peuvent rencontrer ces espèces, alors que les œufs produits sexuellement le sont (Hebert, 1987; Moran, 1992) (Figure 3). Cette espèce, bien que présentant une reproduction parthénogénétique, a donc toujours besoin d'une partie de reproduction sexuée pour se maintenir, empêchant probablement le passage de la parthénogénèse cyclique vers la parthénogénèse obligatoire (Rispe et al., 2002).



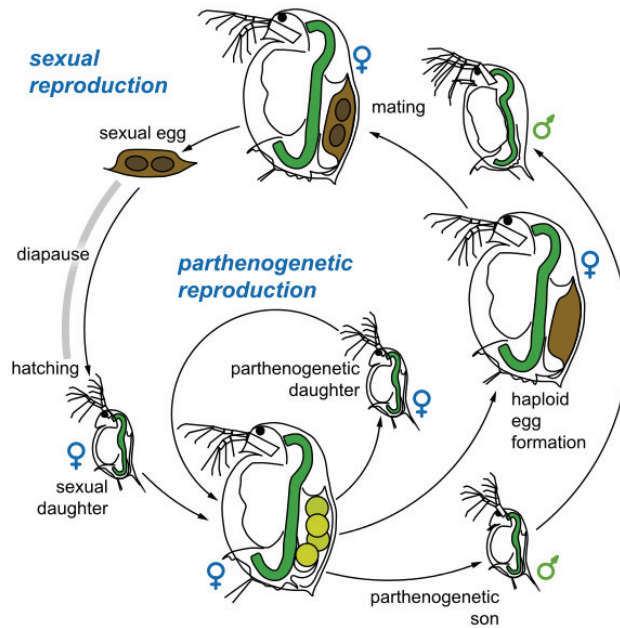


Figure 3: Le cycle de vie de l'espèce *Daphnia magna*.

Les femelles produisent des filles diploïdes par parthénogénèse. Elles sont aussi capables de produire des ovocytes haploïdes et des mâles diploïdes par parthénogénèse. La fécondation de ces ovocytes par les mâles entraînent la production d'œufs résistants qui passeront pas une phase de dormance (diapause) avant de donner des femelles. Figure tirée de (Salathé et al., 2008)

Toutes ces contraintes, spécifiques d'une espèce ou généralisées au règne animal permettent donc de comprendre pourquoi l'asexualité est si peu présente chez les animaux. Ceci peut aussi permettre de comprendre pourquoi certaines formes d'asexualité autre que la parthénogénèse stricte apparaissent. En effet, la parthénogénèse demande l'acquisition de nombreuses innovations cellulaires et moléculaires, tandis que d'autres formes en demandent moins. C'est le cas de la gynogénèse pour laquelle l'espèce doit être capable de réguler la ploïdie grâce à une méiose alternative, mais ne doit pas s'affranchir de l'activation de l'ovocyte ou de l'apport des centrioles par un spermatozoïde.

L'observation d'un grand nombre d'espèces asexuées, et d'espèces sexuées les plus proches permet donc d'estimer les contraintes d'un système de reproduction asexuée. L'identification des innovations cellulaires et moléculaires ayant permis de s'affranchir de ces contraintes reste cependant compliquée car les espèces asexuées ne peuvent pas être étudiées par des approches génétiques classiques. Par ailleurs, ces espèces sont le plus souvent difficiles à entretenir au laboratoire et ne sont pas non plus idéales pour des analyses cytologiques et moléculaires.

## 2. La méiose

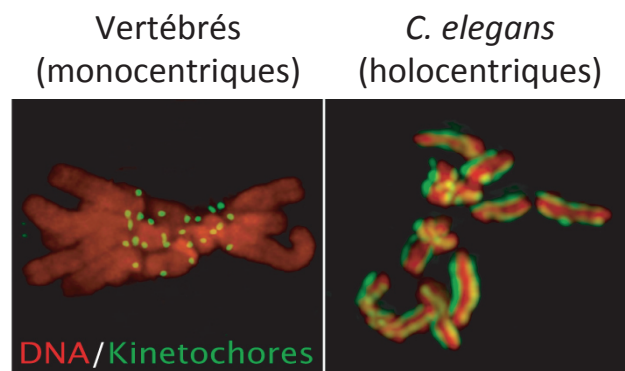
La méiose est un processus cellulaire fondamental du cycle de vie des espèces, elle permet la réparation de l'ADN mais participe aussi au brassage génétique via les crossing-over et la ségrégation des chromosomes. Elle est observée chez les femelles comme chez les mâles pour la plupart des espèces.

La méiose permet de produire 4 cellules haploïdes à partir d'une cellule diploïde. Chez les femelles, une seule de ces cellules deviendra un ovocyte, les trois autres produits de la méiose seront exclus de l'ovocyte en devenir. Chez les mâles, toutes les cellules résultant de la méiose deviendront des spermatozoïdes. Les gamètes ne porteront alors qu'une partie de l'information génétique parentale. Les cellules subissent pour cela une unique étape de réplication de l'ADN, suivie de deux étapes de division cellulaire. La première étape, appelée méiose 1 permet la ségrégation des chromosomes homologues (division réductionnelle), alors que les chromatides sœurs restent associées. La deuxième étape, appelée méiose 2 permet quant à elle la ségrégation des chromatides sœurs (division équationnelle) (Figure 8).

Chez de rares espèces d'insectes, comme les hémiptères, on observe une inversion des deux étapes de méiose (« méiose inversée ») (Viera et al., 2009). Dans ce cas, ce sont d'abord les chromatides sœurs qui se séparent pour chaque chromosome. Les chromatides de chaque chromosome homologue restent cependant cohésives et se sépareront lors de la deuxième division. Ainsi, malgré l'inversion, une chromatide de chaque chromosome homologue est bien présente dans l'ovocyte.

La plupart des mécanismes de la méiose sont conservés de la levure aux mammifères, cependant les protéines impliquées dans ces mécanismes le sont très peu (Grishaeva and Bogdanov, 2017; Speijer et al., 2015). Certaines espèces comme les nématodes ou les pucerons possèdent des chromosomes holocentriques, dont les centromères sont répartis tout le long des chromosomes (Melters et al., 2012) (Figure 4). Cette particularité entraîne certaines spécificités lors de la méiose. Pour comprendre la régulation de la méiose dans l'espèce *M. belari*, j'ai donc choisi de détailler ci-dessous les étapes de la méiose telle qu'elles sont connues pour l'espèce holocentrique *C. elegans*. La résolution spatio-temporelle de la gonade de *C. elegans*

en a fait par ailleurs un modèle pour l'étude plus générale de la méiose et les mécanismes moléculaires y sont donc décrits avec énormément de précision (Hillers et al., 2005). Je décrirai ensuite ce qui est actuellement connu sur les méioses alternatives dans les espèces asexuées. En effet, de nombreux mécanismes méiotiques différents ont été mis en place chez ces espèces afin d'assurer le maintien de la ploïdie.



**Figure 4: Comparaison des chromosomes holocentriques et monocentriques.** Contrairement aux chromosomes monocentriques, les chromosomes des nématodes sont holocentriques, on observe alors la répartition des kinétochores (en vert) tout le long des chromosomes (en rouge) plutôt que de manière ponctuelle. Figure adaptée de (Oegema, 2006)

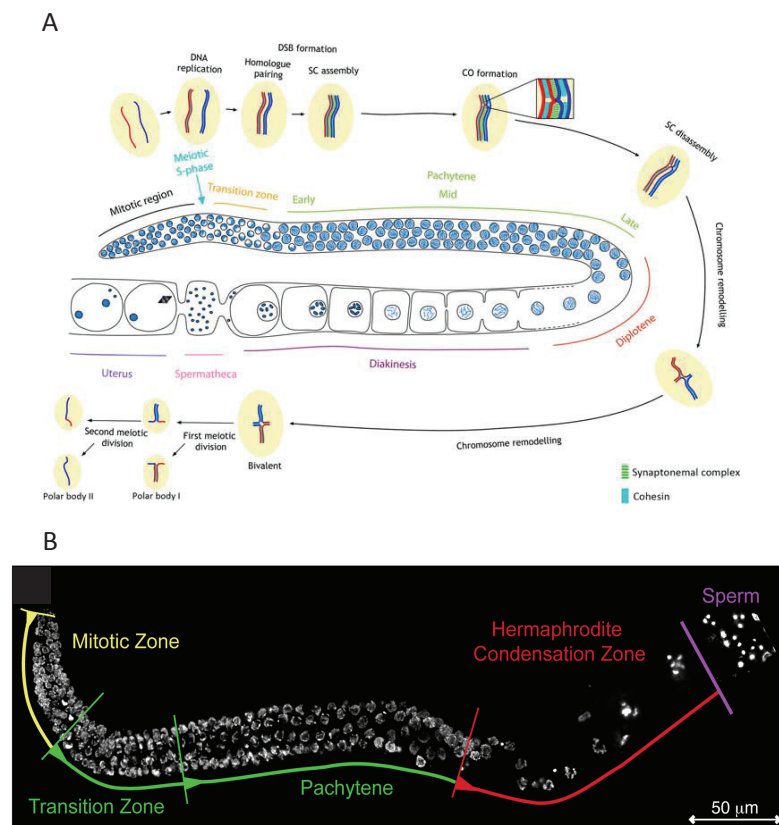
## 2.1 La méiose chez *C. elegans*

*C. elegans* est une espèce hermaphrodite produisant des spermatozoïdes afin de féconder ses propres ovocytes. *C. elegans* possède deux bras de gonades où sont produits les ovocytes qui passeront ensuite par une spermathèque pour être fécondés avant d'être stockés dans l'utérus puis d'être pondus (Figure 5A).

La gonade de *C. elegans* est organisée de manière spatio-temporelle. La partie distale comprend des cellules en mitose, puis plus les noyaux se rapprocheront de la partie proximale, plus ils avanceront dans le cycle méiotique afin d'atteindre le stade de la diakinèse juste avant l'entrée dans la spermathèque (Figure 5B). Cette organisation permet donc facilement d'étudier les différentes étapes de la méiose chez les nématodes. Le dernier ovocyte avant la spermathèque est bloqué en prométaphase de méiose 1 et la fécondation permettra de déclencher la fin de la méiose femelle (Crittenden et al., 1994, 2006; Fox et al., 2011; Jaramillo-Lambert et

al., 2007). Les différentes étapes de la méiose femelle chez *C. elegans* seront détaillées dans les paragraphes suivants.

Les hermaphrodites possèdent deux chromosomes X. Leur transcription est réprimée dans la lignée germinale au stade pachytène. Le chromosome X, à l'inverse des autosomes, est pour cela enrichi en marques épigénétiques répressives (méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone 3 : HEK9me et H3K27me) (Strome et al., 2014) et dépourvu de marques activatrices (H3K4me et le variant H3.3 de l'histone H3) (Arico et al., 2011; Ooi et al., 2006), La régulation de ces marques est en partie effectuée par les protéines MES qui sont impliquées dans les modifications de la chromatine (Strome et al., 2014)



**Figure 5: Organisation de la gonade chez *C. elegans*.** (A) représentation schématique d'un demi bras de gonade postérieure, (B) Observation d'une demi gonade disséquée avec marquage de l'ADN. Les noyaux subissent les premières étapes de méiose et sont bloqués en prométaphase de méiose 1 avant la fécondation. Après le passage dans la spermathèque, les embryons sont fécondés, stockés dans l'utérus et la méiose femelle se poursuit. Durant ces étapes, les chromosomes subissent la réplication, l'appariement des chromatides sœurs puis des chromosomes homologues et enfin la formation des crossing-over. La zone de condensation comprend les phases diplotène et diakinèse. Figures tirées de (Hillers et al., 2005; Shakes et al., 2009)

### 2.1.1 La cohésion des chromatides sœurs

La cohésion entre les chromatides sœurs est établie durant la phase de réplication (Sherwood et al., 2010). Cette cohésion est établie par un complexe de protéines formant le complexe de cohésines nommé « Sister Chromatid Cohesion » (SCC). Ces protéines sont SMC-1 et SMC-3, SCC-3, REC-8, COH-3 et COH-4. (Hagstrom and Meyer, 2003; Lee et al., 2003; Parisi et al., 1999; Pasierbek et al., 2001; Severson et al., 2009). Durant la réplication, les protéines de liaison à l'ADN TIM-1, SCC-4 et SCC-2 permettent l'association des protéines non-SMC à la chromatine (Chan et al., 2003; Lightfoot et al., 2011; Seitan et al., 2006). De plus, les protéines de cohésion PDS-5 et EVL-14 sont responsables de la maintenance de ce complexe. L'absence de PDS-5 ou de SCC-3 entraîne la séparation précoce des chromatides sœurs durant la prophase chez *C. elegans* (Wang et al., 2003). L'absence de REC-8 ainsi que des protéines COH-3 et COH-4 entraîne une perte de la cohésion de ces chromatides sœurs (Severson et al., 2009).

En plus du complexe permettant la cohésion entre les chromatides sœurs, les chromosomes seront associés à d'autres protéines durant la réplication. Ces protéines sont retrouvées le long des chromosomes et constituent une structure appelée « Axial Element ». Les protéines de l'Axial Element sont les protéines HIM-3, HTP-1, HTP-2 et HTP-3 qui ne sont pas des cohésines (Aravind and Koonin, 1998; Martinez-Perez and Villeneuve, 2005; Zetka et al., 1999). Le recrutement de la protéine HTP-3 est inter-dépendent de celui des cohésines du Sister Chromatin Cohesion, et HTP-3 permet le recrutement des protéines HTP-1/2 et HIM-3 (Couteau and Zetka, 2005; Goodyer et al., 2008; Pasierbek et al., 2003; Severson et al., 2009). L'Axial Element est impliqué dans la coordination de plusieurs événements de la méiose qui sont l'appariement des chromosomes homologues, leur synapse et la recombinaison (Couteau et al., 2004; Goodyer et al., 2008; Martinez-Perez and Villeneuve, 2005; Zetka et al., 1999). Par exemple, les mutants *him-3* ne présentent pas d'appariement des chromosomes et les mutants *htp-1/2* présentent une synapse de chromosomes non-homologues (Couteau and Zetka, 2005; Couteau et al., 2004). Ces événements seront détaillés dans les prochains paragraphes.

### 2.1.2 L'appariement des chromosomes homologues

Après leur réplication, les chromosomes vont s'apparier par paires d'homologues au stade zygotène (Figure 6A). Durant cette phase, les noyaux prendront une apparence de « croissant de lune » (Dernburg et al., 1998). Ceci est dû au fait que les chromosomes se déplacent vers un côté du noyau. Tous les chromosomes seront attachés par une extrémité à la membrane nucléaire. Il est considéré que cette réorganisation permet l'appariement des chromosomes homologues en diminuant l'espace dans lequel les chromosomes se trouvent et en triant les chromosomes par taille (Goldstein, 1982; Loidl, 1990; Roeder, 1997; Schlecht et al., 2004).

La reconnaissance entre les chromosomes homologues se fait au niveau de séquences nommées Pairing Center (McKim et al., 1988; Villeneuve, 1994). Ces Pairing Center se trouvent au niveau des extrémités des chromosomes et sont des séquences hautement répétées qui permettent le recrutement des protéines ZIM-1/2/3 et HIM-8 (Phillips and Dernburg, 2006; Phillips et al., 2005, 2009; Sanford and Perry, 2001; Zetka and Rose, 1995). La protéine HIM-8 est recrutée seulement au niveau du chromosome X, tandis que les protéines ZIM sont recrutées au niveau des autosomes. Les protéines ZIM-1 et ZIM-3 sont recrutées au niveau de deux autosomes différents (Phillips and Dernburg, 2006). Le recrutement spécifique des protéines sur seulement un ou deux chromosomes et leur reconnaissance permet donc l'appariement entre homologues (Figure 6A et 6B « Leptotène/Zygotène »).

La réorganisation des chromosomes dans le noyau est due à l'interaction entre les protéines ZIM et HIM-8 avec la protéine SUN-1, du complexe SUN/KASK, localisée au niveau de la membrane nucléaire. La protéine SUN-1 est phosphorylée par la kinase PLK-2 afin de former des agrégats sur la moitié de la surface nucléaire, entraînant les chromosomes dans cette partie du noyau (Harper et al., 2011; Penkner et al., 2009). La protéine SUN-1 effectue la liaison entre les microtubules et la chromatine et permet l'appariement des chromosomes. Son interaction avec les microtubules lui permet de se déplacer le long de l'enveloppe nucléaire et de faciliter la rencontre des chromosomes homologues (Figure 6A).

L'interaction entre les Pairing Center des chromosomes homologues permet la mise en place de la synapse, requise pour une interaction stable entre les chromosomes homologues (MacQueen et al., 2005). Par exemple, dans les mutants *him-8*, on observe une ségrégation altérée du chromosome X à cause de leur mésappariement, entraînant la production d'ovocytes ne contenant pas de chromosome X (Phillips et al., 2005). Dans ces ovocytes, un seul chromosome X sera apporté par le spermatozoïde, et ces embryons se développeront en mâle car le déterminisme du sexe est de type XX/X0 chez *C. elegans*.

### 2.1.3 La synapse

La synapse permet l'appariement stable des chromosomes homologues grâce à l'interaction de protéines formant le Complexe Synaptonemal au stade pachytène. Le Complexe Synaptonemal est une structure comprenant les protéines SYP-1, SYP-2, SYP-3, SYP-4, qui interagissent entre elles ainsi qu'avec les protéines de l'Axial Element (Colaiácovo et al., 2003; MacQueen et al., 2002; Smolikov et al., 2007a). Cette structure permet donc de relier les chromosomes homologues entre eux, elle est pour cela présente tout le long des chromosomes (Figure 6B « pachytène »). Les protéines SYP-1/2/3/4 forment la région centrale, elles sont dépendantes les unes des autres pour leur assemblage au centre des chromosomes (Colaiácovo et al., 2003; Smolikov et al., 2009). La synapse semble se former au niveau des Pairing Center puis polymérise le long des chromosomes (MacQueen et al., 2005). Cette polymérisation est dépendante de la protéine CRA-1. Les mutants *cra-1* présentent une discontinuité du Complexe Synaptonemal le long des chromosomes (Smolikov et al., 2008).

Chez d'autres espèces comme chez les levures et les mammifères, la formation de la synapse est dépendante de l'initiation des événements de recombinaison. En revanche, chez *C. elegans*, la synapse peut avoir lieu sans ses événements (Baudat et al., 2000; Dernburg et al., 1998; Giroux et al., 1989; Grelon et al., 2001; McKim et al., 1998).

Le Complexe Synaptonemal permet l'appariement maximum entre les chromosomes homologues (Daniel et al., 2011; Nag et al., 1995; Peoples et al., 2002; Peoples-Holst and Burgess, 2005). De plus, le Complexe Synaptonemal permet la recombinaison entre les chromosomes homologues et la formation des crossing-over. Sans cet appariement, les chromosomes accumulent des formes intermédiaires de recombinaison sans terminaison du processus, et les chromosomes ont un taux de crossing-over faible. (Colaiácovo et al., 2003; MacQueen et al., 2002; Smolikov et al., 2007b, 2009)

#### 2.1.4 **La recombinaison**

La recombinaison est le mécanisme permettant l'échange de brins de chromatides entre chromosomes homologues au stade pachytène tardif. Ce mécanisme permet le mélange de l'information génétique et ainsi la production des gamètes qui porteront toutes une information génétique différente.

Durant les stades pachytène et diplotène, les territoires chromosomiques des bivalents seront définis (Figure 6B « Pachytène » et « Diplotène »). Chez *C. elegans*, un seul crossing-over est observé par chromosome (Nabeshima et al., 2005). Les cassures double brin de l'ADN sont à l'origine de la recombinaison et donc des crossing-over. Cependant, alors que chaque chromosome subit plusieurs cassures, une seule de ces cassures deviendra le point d'initiation des crossing-over (Barnes et al., 1995; Mets and Meyer, 2009). Les autres cassures seront réparées par un système n'entraînant pas l'échange de fragments de chromosomes, et seront résolus sous forme de « non crossover » (Figure 6B « Diakinèse/Métaphase 1).

C'est la topoisomérase SPO-11 qui est à l'origine des cassures double brin (Dernburg et al., 1998; Keeney, 2001). Par la suite, les cassures sont prises en charge par les protéines MRE-11, RAD-50, RAD-51 et COM-1 (Chin and Villeneuve, 2001; Hayashi et al., 2007; Penkner et al., 2007; Sun et al., 1991). La recombinaison sera effectuée entre deux chromatides n'appartenant pas au même chromosome, résultant en l'apparition de jonctions de Holliday, la résolution des jonctions de Holliday par l'échange des fragments d'ADN entre chromatides non soeurs entraîne

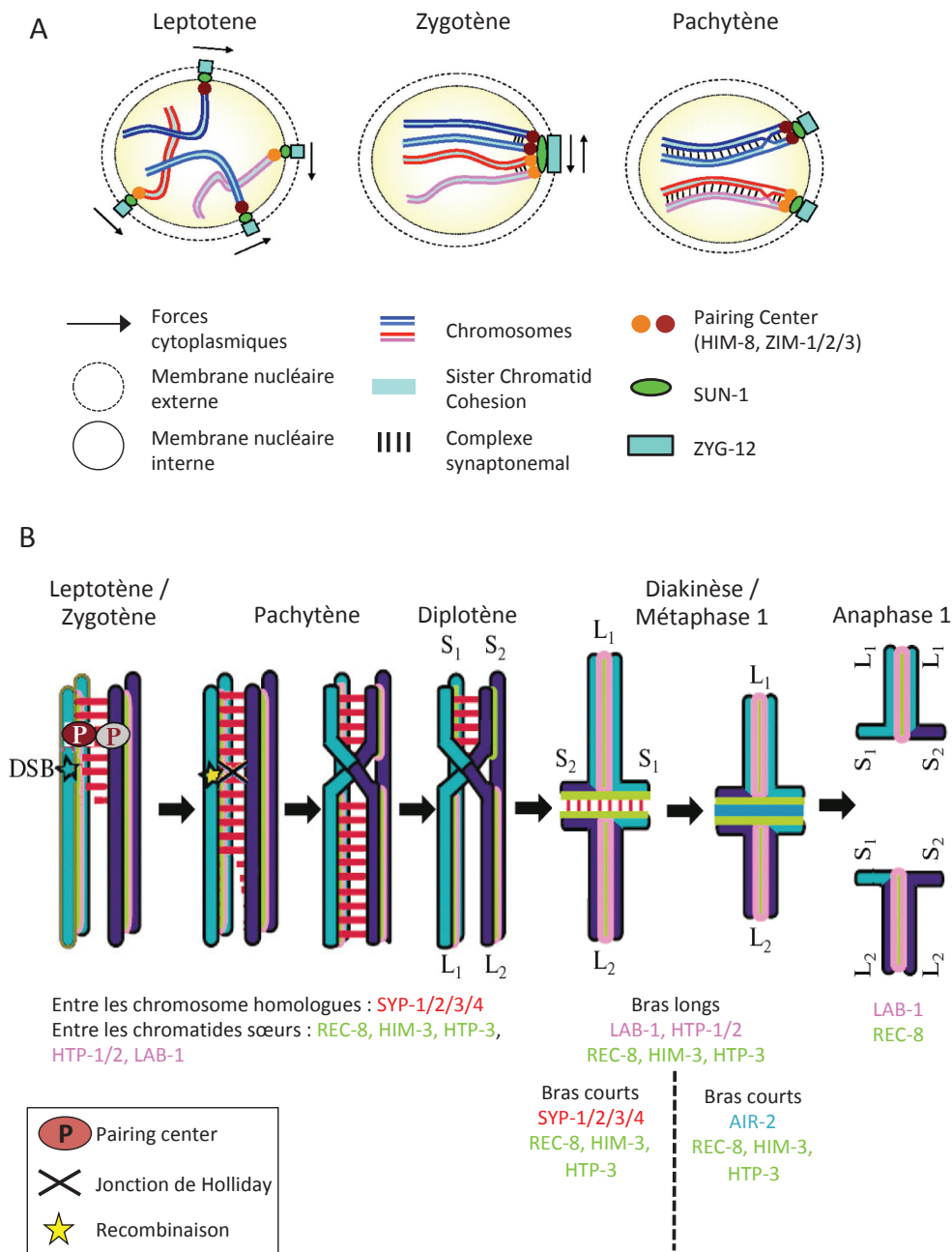


l'apparition du crossing-over. Les protéines ZHP-3, MSH-4 et MSH-5 sont nécessaires à la formation de ces crossing-over (Kelly et al., 2000; Snowden et al., 2004; Winand et al., 1998; Zalevsky et al., 1999). Les protéines permettant de résoudre les cassures par coupure et ligation ne sont pas encore bien connues chez *C. elegans* (Saito et al., 2009; Schwartz and Heyer, 2011).

Chez *C. elegans*, les crossing-over ne sont pas distribués de manière aléatoire le long des chromosomes. En effet, ils ont tendance à se former entre l'extrémité des chromosomes et le tiers de leur longueur, dans des régions pauvres en gène (Barnes et al., 1995; Hillers and Villeneuve, 2003). C'est la localisation déterminée de ces crossing-over qui définit la forme en croix des chromosomes appariés, avec des petits et des grand bras de chromosomes. La forme adoptée par les chromosomes, appelée chiasma, est la manifestation cytologique des crossing-over, eux mêmes étant le produit de la recombinaison.

Trois mécanismes sont mis en place pour assurer la présence d'un crossing-over par chromosome, ce sont les mécanismes de « crossover assurance » permettant d'établir que chaque paire de chromosomes reçoive un crossing-over, et « crossover homeostasis » et « crossover interference » permettant d'empêcher la formation d'un crossing-over supplémentaire quand un premier est déjà formé (Wang et al., 2015).

Lorsque les chromosomes prendront une forme de croix, les bras longs constitueront l'appariement entre les chromatides sœurs et les bras courts celui entre les chromosomes homologues. Durant cette transition, le Complexe Synaptonemal sera désassemblé au niveau des bras longs, et sera seulement maintenu au niveau des bras courts (MacQueen et al., 2002; Nabeshima et al., 2005). Cet événement requiert des protéines impliquées dans la formation des crossing-over telles que ZHP-3, MSH-4 et MSH-5 (Bhalla et al., 2008; Nabeshima et al., 2005). Les protéines COH-3, COH-4, HTP-1 et HTP-2 seront seulement localisées sur les bras longs alors que la protéine REC-8 se situera sur les deux bras (Goodyer et al., 2008; Martinez-Perez et al., 2008; Zetka et al., 1999).



**Figure 6: Mise en place de la cohésion des chromatides sœurs et des chromosomes homologues durant la méiose.**

(A) Deux paires de chromosomes homologues sont représentées en nuance de bleu et de rouge. Les protéines du pairing center sont liées aux chromosomes et à la protéine SUN-1. La protéine ZYG-12 fait le lien entre les microtubules et la protéine SUN-1. Le mouvement des protéines SUN-1 le long de la membrane permet le rapprochement de chromosomes homologues et la reconnaissance entre les protéines du pairing center permet leur appariement. Par la suite, le complexe synaptonemal se met en place le long des chromosomes à partir des pairing center. (B) Une paire de chromosomes homologues est représentée. Les chromosomes sont représentés par une nuance différente de bleu. La cohésion entre les chromatides sœurs se met en place durant la réplication de l'ADN. A partir des pairing center permettant la reconnaissance entre les chromosomes homologues, la synapse se met en place. Au niveau d'une des cassures doubles brins, la résolution se fait sous la forme de jonction de Holliday qui donne lieu à un crossing-over et à l'échange de chromatides entre chromosomes homologues. Les bivalents prennent alors une forme de croix (chiasma) et les protéines de cohésion se répartissent le long des bras courts et/ou longs. Le complexe synaptonemal est éliminé à la fin de la diakinèse puis les chromosomes homologues se

séparent lors de l'anaphase de première division méiotique. La présence d'AIR-2 seulement au niveau des bras courts permet le maintien de la cohésion entre les chromatides sœurs. Durant l'anaphase de méiose 2, les chromatides sœurs seront séparées (étape non représentée sur le schéma). Figures adaptées de (Bogdanov, 2017; Tsai and McKee, 2011)

### 2.1.5 La séparation des chromosomes homologues

De par la répartition des territoires chromosomiques, les chromosomes homologues peuvent être séparés durant la méiose 1 sans que les chromatides sœurs le soient. Ceci est dû à la localisation des différentes cohésines le long des bras courts ou longs des bivalents (Figure 6B « Anaphase 1 »).

Au niveau des bras courts des bivalents, la phosphorylation de la thréonine 3 de l'histone H3 (H3T3) provoquée par la protéine HASP-1 permet le recrutement de la kinase AIR-2 (Ferrandiz et al., 2018). La kinase AIR-2 est quant à elle responsable de la phosphorylation de REC-8 se trouvant au niveau des bras courts et longs des bivalents (Kaitna et al., 2002; Rogers et al., 2002). On retrouvera sur les bras longs les protéines HTP-1 et HTP-2 qui permettent l'absence de séparation des chromatides sœurs durant la première méiose (Martinez-Perez et al., 2008). Les protéines HTP-1 et HTP-2 sont en effet responsables du recrutement de la protéine LAB-1 (de Carvalho et al., 2008; Martinez-Perez et al., 2008). Cette protéine, interagit avec la Protéine Phosphatase 1 (PP1) qui permet l'inhibition de la phosphorylation de l'H3T3. Cette absence de phosphorylation entraîne en retour l'éviction de la kinase AIR-2 au niveau des bras longs (Ferrandiz et al., 2018).

Ainsi, la présence de AIR-2 au niveau des bras courts des bivalents entraîne la phosphorylation de REC-8 seulement au niveau de ces bras courts. La phosphorylation de REC-8 lui permet par la suite d'être ciblé par la séparase. Cet événement permet ainsi le clivage de la cohésine retenant les chromosomes homologues. L'absence de la protéine AIR-2 au niveau des chromatides sœurs ainsi que la présence des cohésines COH-3 et COH-4 permet aux chromatides sœurs de ne pas être séparées durant l'anaphase de méiose 1 (Severson et al., 2009).

Par la suite, les chromosomes s'aligneront de nouveau sur la plaque métaphasique et les chromatides sœurs seront séparées les unes des autres durant

la deuxième division de méiose. Les mécanismes permettant le clivage des cohésines entre les chromatides sœurs ne sont pas encore connus.

Les événements décrits ici sont à l'origine de la ségrégation du nombre correct de chromosomes au sein de chaque gamète. Certains mutants comme les mutants *rec-8*, *htp-1/2* ou *htp-3* présentent une séparation précoce des chromatides sœurs durant l'anaphase de méiose 1 (Martinez-Perez et al., 2008; Severson et al., 2009) (Figure 7). Cette séparation précoce est due au fait que les chromosomes homologues ne sont pas maintenus sous forme de bivalents. De ce fait, durant l'anaphase de méiose 1, chaque chromosome sera aligné sur la plaque métaphasique, entraînant la séparation des chromatides sœurs précocement en anaphase de méiose 1. Le pronoyau femelle sera alors diploïde, puisqu'il contiendra deux fois trop de chromatides par rapport à un pronoyau provenant d'une cellule ayant subi deux divisions de méiose.



**Figure 7: L'absence de la protéine HTP-1 entraîne la disjonction des chromosomes homologues en diakinèse chez *C. elegans*.**

**Chez le sauvage, 6 points sont observés correspondant aux 6 paires de chromosomes homologues organisés en bivalents. En l'absence de la protéine HTP-1, 12 points sont observés correspondant aux 6 paires de chromosomes homologues non appariés. Figure adaptée de (Ferrandiz et al., 2018)**

## 2.2 Les méioses alternatives

Chez les espèces asexuées qui conservent le processus méiotique, on peut observer différents types de méiose qui ne respectent pas toujours les étapes de la méiose dite conventionnelle. Ces différents types de méiose permettent à une espèce asexuée de garder certains avantages liés à la méiose tout en maintenant la ploïdie nécessaire au développement de la descendance (Mirzaghaderi and Hörandl,

2016). De nombreux mécanismes existent afin de maintenir la diploïdie et sont apparus plusieurs fois indépendamment chez les espèces asexuées. Pour produire les gamètes, les espèces asexuées peuvent soit ne pas subir une mitose, soit ne subir qu'une des deux divisions de méiose, soit subir la méiose puis rétablir la diploïdie ultérieurement. Ces différents types de méiose qui seront décrits dans ce chapitre entraînent des conséquences très différentes sur la dynamique du génome. La plupart du temps, chez ces espèces, l'hétérozygotie n'est pas maintenue.

### 2.2.1 L'apomixie

L'apomixie implique la suppression de la méiose et la ségrégation des chromosomes semblable à celle d'une mitose. Les zygotes produits contiennent donc une information génétique identique à celle de la mère puisqu'il n'y a pas d'étape de fécondation. Ce type de reproduction est retrouvé chez les invertébrés comme les Rotifères, il n'entraîne alors pas de diversité génétique entre les parents et leur descendance (Butlin, 2002; Flot et al., 2013; Simon et al., 2003).

Chez l'espèce *Daphnia pulex*, il a par ailleurs été montré que la première division de méiose est arrêtée lors de l'anaphase, bien qu'elle soit mise en place. Les chromosomes homologues sont appariés durant la métaphase puis se séparent durant l'anaphase de méiose 1. Cependant, la moitié des chromosomes n'est pas exclue de la cellule, et tous les chromosomes s'alignent de nouveau sur la plaque cette fois de manière non appariée. Par la suite, une deuxième anaphase aura lieu, cette fois ségrégeant complètement la moitié des chromatides dans un globule polaire. L'ovocyte résultant de cette division est donc diploïde et comporte la même information génétique que celle de la cellule mère. Dans ce cas la méiose 1 sera dite abortive (Hiruta et al., 2010).

### 2.2.2 Les méioses incomplètes

Les méioses incomplètes entraînent la production de gamètes diploïdes par l'élimination d'une des deux étapes de ségrégation des chromosomes. Ces types de

division sont aussi souvent retrouvés chez les organismes polyploïdes où la rencontre de gamètes non haploïdes entraîne le développement d'un zygote polyploïde.

#### 2.2.2.1 Méiose 1 unique

Dans le cas d'une méiose 1 unique, seule la première étape de la méiose est conservée, les bivalents sont appariés sur la plaque métaphasique et ségrégués dans deux cellules différentes. En revanche, la deuxième étape de méiose ne se produit pas, les chromatides sœurs de chaque chromosome seront donc conservées dans la cellule fille (Bretagnolle and Thompson, 1995) (Figure 8).

La séparation des chromatides sœurs sans ségrégation dans de nouvelles cellules filles entraîne donc l'obtention de deux cellules diploïdes partageant partiellement l'hétérozygoté parentale via les échanges de matériel génétique entre les chromosomes homologues, il est estimé que 30 à 40% de l'hétérozygoté parentale est transmise à la descendance dans ce cas (Cuenca et al., 2015). Chez les plantes, ce type de méiose est appelé « Second Division Resitution » et permet de produire des gamètes diploïdes. La polyploïdie de l'organisme peut ainsi être restaurée via la fécondation.

#### 2.2.2.2 Meiose 2 unique

Dans le cas d'une méiose 2 unique, les chromosomes se comportent comme lors d'une mitose. La première division de méiose n'a pas lieu, les chromosomes homologues ne s'alignent pas de manière appariée sur la plaque métaphasique (Figure 8). Les chromatides sœurs de tous les chromosomes seront alors séparées lors d'une unique étape de méiose comparable à l'étape de méiose 2. Avant l'alignement des chromosomes sur la plaque, les bivalents peuvent se former, ainsi que des crossing-over qui permettront l'échange de matériel génétique. En revanche, l'appariement des bivalents ne sera pas maintenu avant l'étape de ségrégation (Bretagnolle and Thompson, 1995).

Cette division méiotique s'apparente donc à une division mitotique, entraînant ainsi la production de gamètes diploïdes conservant l'hétérozygotie parentale. Cependant, si la recombinaison est conservée, l'hétérozygotie ne sera pas maintenue au niveau des locus échangés, il est estimé que 70 à 80% de l'hétérozygotie parentale sera transmise à la descendance dans ce cas (Cuenca et al., 2015). Chez les plantes, ce type de méiose est appelé « First Division Resitution » et permet de produire des gamètes diploïdes. La polyploïdie de l'organisme peut ainsi être restaurée via la fécondation.

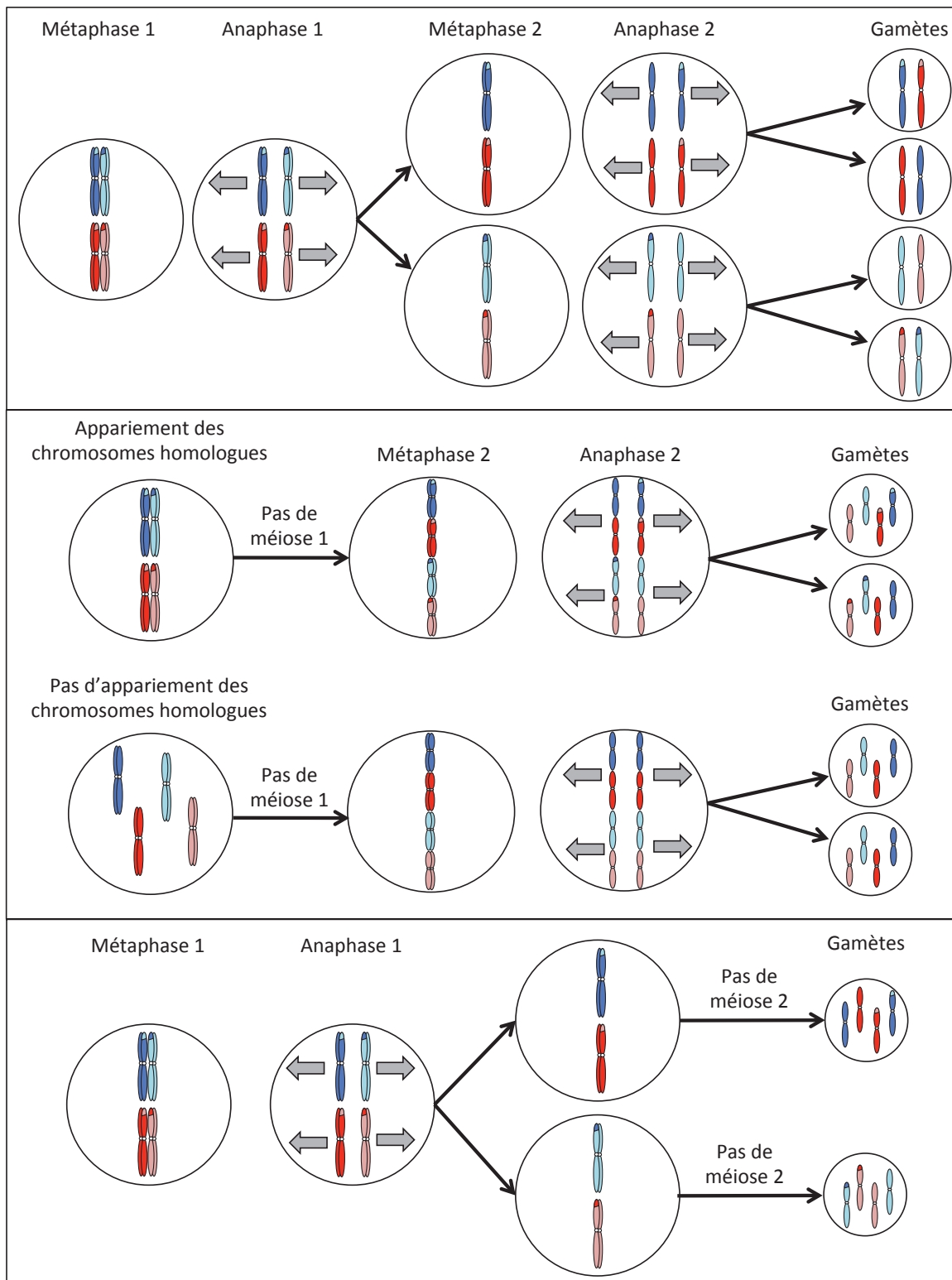


Figure 8 : Représentation schématique de différents types de méiose.

Panel haut, méiose canonique donnant des gamètes haploïdes, panel du milieu méiose 2 unique et panel du bas méiose 1 unique générant des gamètes diploïdes. Deux paires de chromosomes homologues sont représentées en nuance de bleu ou de rouge. Chaque gamète ne devient pas l'ovocyte, mais les différents types de gamètes peuvent être produits et donner un ovocyte. Les événements de recombinaison sont matérialisés par un échange de matériel entre les chromosomes homologues. Selon la disposition des chromosomes sur la plaque métaphasique en méiose 1 et 2, les types de gamètes produits ne seront pas les mêmes. Lors d'une méiose 2 unique,



les chromosomes hérités sont tous différents sauf pour les parties recombinaées, lors d'une méiose 1 unique c'est l'inverse qui se produit.

### 2.2.3 L'automixie

L'automixie est la capacité de rétablir la diploïdie après une méiose à deux étapes, soit par duplication de gamètes, soit par la fusion de gamètes. Dans les deux cas, les gamètes produits constitueront des zygotes qui se développeront de manière parthénogénétique. La plupart des animaux parthénogénétiques se reproduisent via l'automixie (Simon et al., 2003). Les deux divisions de méiose sont conservées, mais le gamète final est diploïde avec un niveau plus élevé d'homozygotie que celui des cellules parentales.

#### 2.2.3.1 Duplication de gamètes

La méiose à deux étapes permet à une cellule mère diploïde de produire 1 cellule œuf haploïde. Lors de la duplication des gamètes, le contenu chromosomique de cette cellule sera doublé, engendrant ainsi une cellule diploïde qui constituera le zygote. Cette duplication a pour conséquence de produire des cellules totalement homozygotes. La duplication de gamètes est notamment observé chez plusieurs espèces d'insectes (Schön et al., 2009)

#### 2.2.3.2 Fusion de gamètes

Lors de la fusion de gamètes, 4 cellules filles haploïdes sont aussi produites, or, la diploïdie est restaurée ici par la fusion de deux de ces cellules (Figure 9). En fonction du contenu génétique des cellules subissant la fusion, l'hétérozygotie sera maintenue ou non. La fusion terminale résulte en la fusion de gamètes qui ont été séparés durant la deuxième division de méiose, c'est le cas de l'espèce *Daphnia magma* (Svendsen et al., 2015) alors que la fusion centrale résulte de la fusion de gamètes qui ont été séparés durant la première division de méiose, c'est le cas de l'espèce *Artemia parthenogenetica* (Nougué et al., 2015).

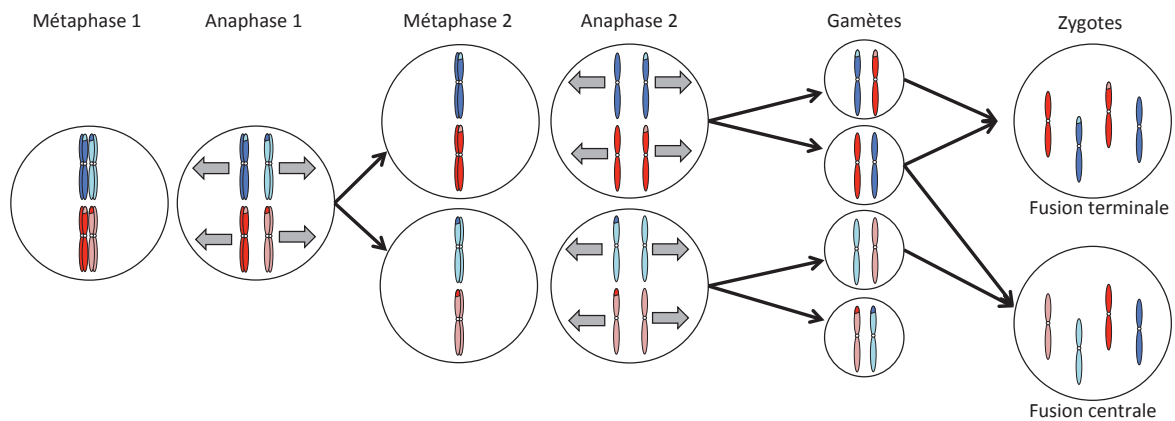
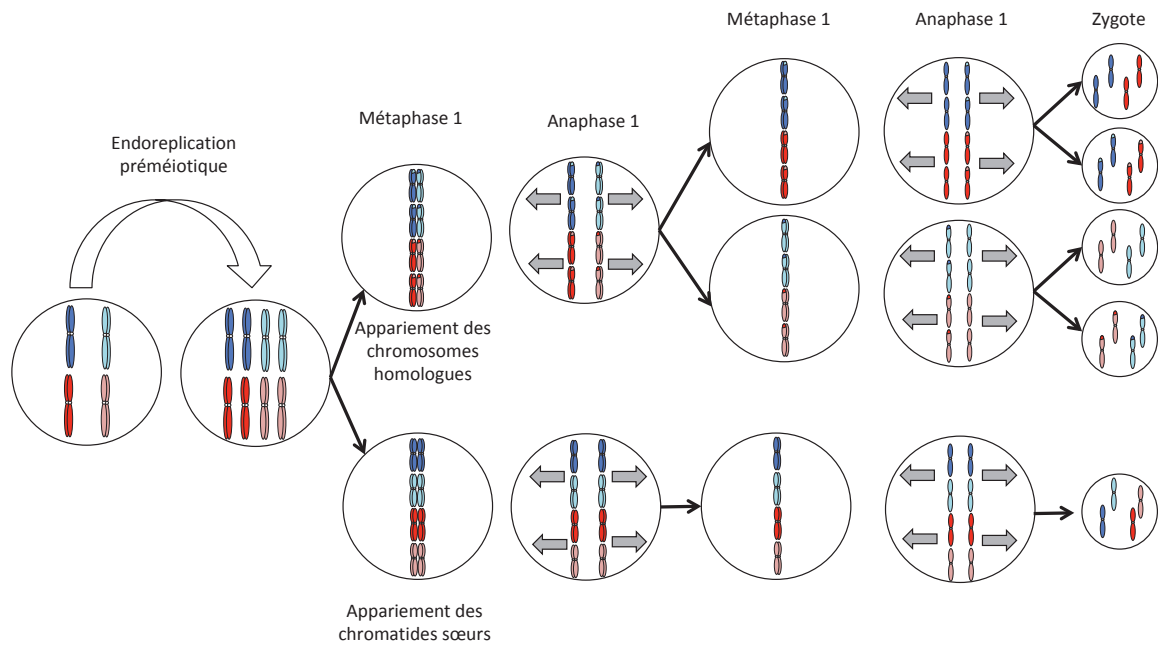


Figure 9: Schéma explicatif de la fusion de gamètes.

La fusion terminale et la fusion centrale sont toutes deux effectuées après la fin de la méiose et se distinguent par le type de gamètes qui seront fusionnés pour donner le zygote. Lors de la fusion centrale, l'homozygotie est complète sauf au niveau des sites recombinés. Lors de la fusion terminale, l'hétérozygotie est complète sauf pour les sites recombinés.

#### 2.2.4 La méiose avec appariement des chromatides sœurs

Chez les lézards des espèces *Apidoscelis tesselata* et *Apidoscelis neomexicana*, les femelles parthénogénétiques produisent des ovocytes diploïdes grâce à une duplication pré-méiotique de l'ADN. Après cette duplication, les 4 chromatides sœurs s'apparient au lieu des chromosomes homologues (Figure 10). L'absence d'appariement entre les chromosomes homologues permet le maintien de l'hétérozygotie chez ces espèces, tout en maintenant la diploïdie des zygotes (Lutes et al., 2010).



**Figure 10: Représentation schématique de la méiose avec endoréplication préméiotique.** Lors de l'appariement des chromosomes homologues après l'endoréplication l'homozygotie sera complète. Lors de l'appariement des chromosomes homologues, la recombinaison ne peut pas produire d'échange de matériel génétique, la cellule produite hétéritera complètement de l'hétérozygotie de la cellule mère.

Les différents types de méiose alternative permettent de maintenir le niveau de ploïdie de l'organisme. Il semblerait donc que chez les espèces asexuées, la méiose ait évolué pour permettre le maintien d'un nombre correct de chromosomes dans la descendance.

Cependant, les espèces possédant des méioses alternatives sont sujettes à la perte de variation génétique. Selon le type de méiose, la descendance maintiendra plus ou moins de sites hétérozygotes, mais, sur le long terme, ces espèces ne devraient plus maintenir de variabilité.

Malgré les nombreuses variétés de méiose, seules quelques unes ne semblent pas maintenir certains événements de la méiose 1 qui sont, l'appariement des chromosomes homologues ainsi que la formation et la réparation des cassures double brin, bien que la recombinaison n'entraîne pas toujours la formation de crossing-over (Mirzaghaderi and Hörandl, 2016). Il semblerait donc que chez ces espèces, les événements précoces de la méiose soient maintenus afin de réparer l'ADN et non pas de maintenir ou de créer de la variabilité génétique. En effet, plusieurs théories proposent une explication pour le maintien de la méiose

indépendamment de l'apport de variabilité génétique. Ces théories supposent que la méiose à un intérêt au niveau de la réparation de l'ADN comme l'élimination des mutations délétères via la sélection (Muller, 1964), la réparation des cassures doubles brin (Bernstein et al., 1985), ou l'élimination des dommages causés par le stress oxydatif (Hörandl, 2013; Hörandl and Hadacek, 2013). En accord avec cette hypothèse, les Rotifères qui se reproduisent par apomixie et ne subissent donc pas les étapes précoces de la méiose possèdent un enrichissement des gènes impliqués dans la résistance au stress oxydatif et la régulation des éléments transposables (Flot et al., 2013). Le maintien des premières étapes de la méiose 1, ainsi que les innovations permettant le maintien de la ploïdie semblent donc nécessaires chez les individus à reproduction asexuée.

### **3. Les spermatozoïdes et la contribution paternelle à la fécondation**

Dans ce chapitre, je décrirai les étapes de la spermatogénèse et la contribution des spermatozoïdes dans l'ovocyte en me référant principalement à ce qui est connu dans l'espèce la plus proche de *M. belari*, à savoir *C. elegans*. Dans certains cas, je citerai également les connaissances d'autres systèmes modèles qui nous ont inspirées pour comprendre les mécanismes de condensation de l'ADN lors de la spermatogénèse et de décondensation de l'ADN après la fécondation.

#### **3.1 La formation des spermatozoïdes**

Au contraire des femelles, la méiose chez les mâles conduit à la production de 4 gamètes à partir d'une cellule initiale. De manière générale, les spermatocytes primaires subissent la première étape de méiose pour donner 2 spermatocytes secondaires. Les 2 spermatocytes secondaires subiront chacun la deuxième division de méiose pour donner 4 spermatides. Après une étape de maturation, appelée spermiogénèse, les spermatides deviendront des spermatozoïdes matures. Les spermatozoïdes sont des petites cellules très spécialisées. La plupart du temps ils sont munis d'un flagelle leur permettant de se mouvoir, ils comportent aussi des

mitochondries nécessaires à leur motilité et un acrosome (fine membrane recouvrant la tête du spermatozoïde) nécessaires à la fusion membranaire avec l'ovocyte lors de la fécondation (Bleil and Wassarman, 1983). De plus, ces cellules possèdent un ADN extrêmement compacté leur permettant d'atteindre une petite taille. Chez les nématodes, les spermatozoïdes ne sont pas flagelés mais se déplacent de manière améboïde grâce à un pseudopode et ne possèdent pas d'acrosome (L'Hernault, 2006).

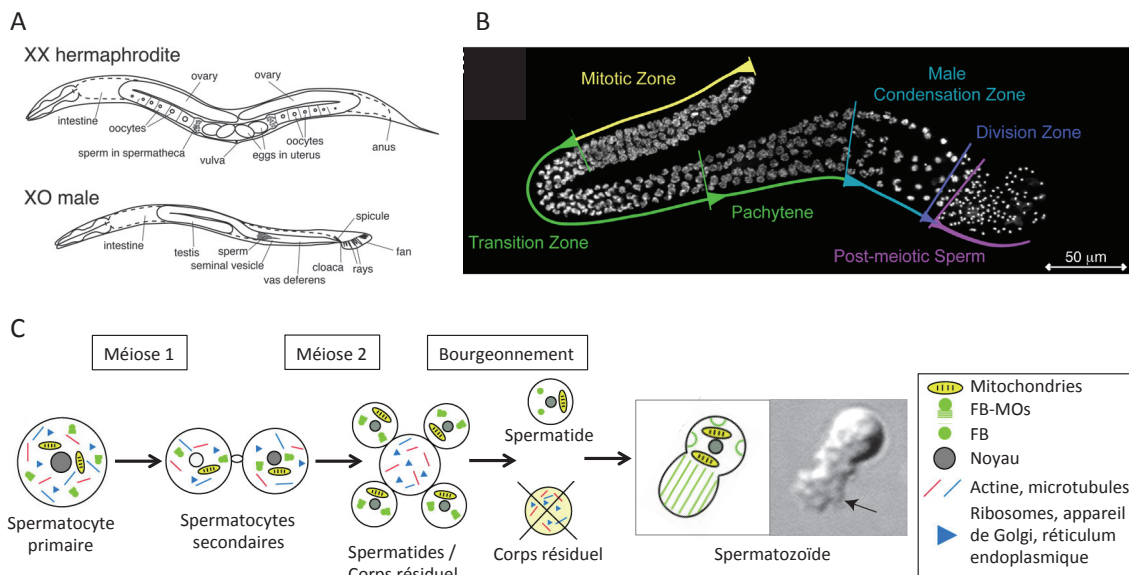
Chez *C. elegans*, une faible proportion de mâles est observée naturellement. Les hermaphrodites produisent environ 0,2% de mâles dans la population, ces mâles ne produiront que des spermatozoïdes et seront capables de féconder des hermaphrodites (Hodgkin and Doniach, 1997; Ward and Carrel, 1979). Les hermaphrodites produisent des spermatozoïdes seulement au stade L4 ils commenceront ensuite à produire des ovocytes. Les spermatozoïdes seront alors stockés pour être utilisés durant l'intégralité du cycle reproductif de l'individu (L'Hernault, 2006) (Figure 11A).

Comme les hermaphrodites, les mâles possèdent une gonade organisée de manière spatiotemporelle, avec des cellules en mitose dans la partie distale et des spermatozoïdes matures dans la partie la plus proximale (Sulston et al., 1980) (Figure 11B). Chaque noyau va subir la méiose et produire 4 spermatozoïdes haploïdes. Les spermatocytes primaires subissent la méiose 1 pour donner deux spermatocytes secondaires sans clivage complet entre les deux cellules. Les spermatocytes secondaires subiront la méiose 2 pour donner 4 spermatides reliées entre elles par un corps résiduel non nucléé. Le corps résiduel contient les éléments non nécessaires à la poursuite de la spermatogénèse jusqu'à la fin de la méiose comme les ribosomes, l'appareil de golgi, le réticulum endoplasmique, les filaments d'actine et de microtubules. Après les étapes de méiose, les spermatides se détachent du corps résiduel et donneront des spermatozoïdes d'environ 5µm. Les spermatozoïdes contiennent l'ADN paternel ultracondensé, des mitochondries, un organite nommé « Fibrous-body-membranous organelles » (FB-MOs), et une paire de centrioles (L'Hernault, 2006; Nishimura and L'Hernault, 2010) (Figure 11C).

Les FB-MOs sont formés durant le processus de spermatogénèse. Le « Fibrous Body » est composé en majorité de protéines Major Sperm Protein (MSP)

et les « Membranous Organelles » sont des vésicules formées à partir de l'appareil de Golgi. Le FB-MOs permet de séquestrer les protéines retenues dans les spermatides lors de la spermatogénèse et les « Membranous Organelles » fusionnent à la membrane plasmique de l'ovocyte pour y relarguer leur contenu lors de la fécondation (Roberts et al., 1986; Ward, 1986). Les « Membranous Organelles » semblent fonctionner de la même manière que l'acrosome présent chez les autres espèces (Figure 11C).

Les mouvements améboïdes du pseudopode sont contrôlés par les protéines du complexe de protéines MSP. Chez *C. elegans*, MSP comprend une famille de 28 gènes qui produisent des isoformes très identiques les unes aux autres. Durant la spermatogénèse, les protéines du complexe s'assemblent en filaments et sont ancrées à la membrane. Les protéines sont ainsi séquestrées dans les spermatides, et ne partent pas dans le corps résiduel. A l'avant du pseudopode les filaments de MSP s'assemblent, alors qu'ils se désassemblent à l'arrière, entraînant le mouvement améboïde (Italiano et al., 2001; L'Hernault, 2006; Ward and Klass, 1982) (Figure 11C).



**Figure 11: La spermatogénèse chez *C. elegans*.**

**(A)** Schéma illustratif de la gonade chez les hermaphrodites et les mâles de l'espèce *C. elegans*. Contrairement aux hermaphrodites, les mâles ne possèdent qu'un seul bras de gonade. **(B)** La gonade des mâles ne produit que des spermatozoïdes, les étapes de la méiose sont les mêmes que chez les hermaphrodites. **(C)** 4 spermatozoïdes sont produits à partir d'un spermatocyte primaire. La première division de méiose produit deux spermatocytes secondaires non disjoints. Durant la deuxième division de méiose, chaque spermatide est divisée en deux pour produire 4 spermatozoïdes

au total qui bourgeonneront à partir d'un corps résiduel. Le corps résiduel contient toutes les structures non nécessaires à la fertilité. Chaque spermatide se sépare ensuite du corps résiduel et donne un spermatozoïde mature. Les spermatozoïdes matures possèdent alors un pseudopode à l'avant leur permettant de se déplacer grâce au réseau de Major Sperm Protein (filaments verts). Le pseudopode est indiqué par la flèche sur l'image de microscopie en DIC. Figures adaptées de (Kelleher et al., 2000; Shakes et al., 2009)

Chez *C. elegans*, environ 60 gènes sont connus pour affecter la spermatogénèse, ces gènes sont nommés les gènes *spe* pour « spermatogenesis defective » (L'Hernault and Singson, 2000). Ces gènes affectent soit la spermatogénèse (la production des spermatides) soit la spermiogénèse (l'activation des spermatozoïdes matures). Le seul gène connu pour affecter la méiose durant la spermatogénèse chez *C. elegans* est le gène *wee-1.3* (Lamitina and L'Hernault, 2002).

Lorsque les hermaphrodites sont mutés pour les gènes *spe*, les mêmes phénotypes sont observés que chez les mâles au niveau de la spermatogénèse, indiquant que les mêmes étapes de ce processus existent lors de la spermatogénèse chez les hermaphrodites et chez les mâles. Tous les mutants connus affectent la formation des spermatides, la maturation des spermatozoïdes ou la fécondation. Aucun mutant n'a été observé jusqu'alors pour lequel la condensation de l'ADN paternel serait affectée (Nishimura and L'Hernault, 2010).

### 3.1.1 La compaction de l'ADN

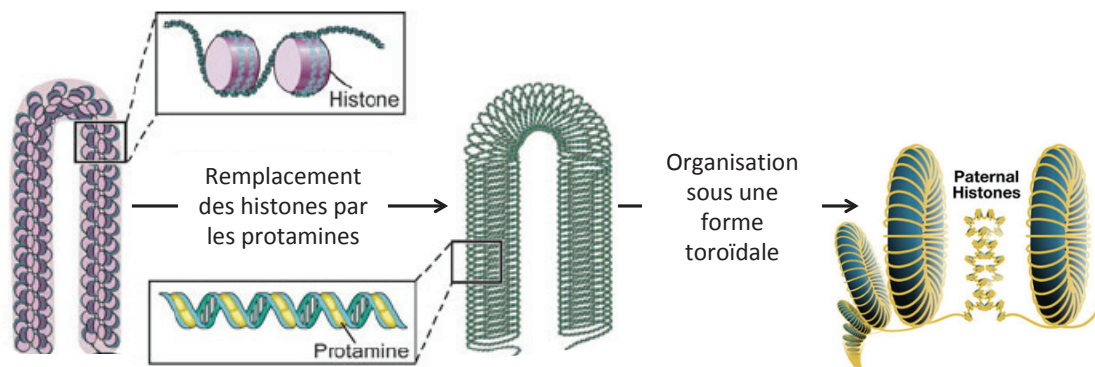
Les mécanismes de compaction de la chromatine durant la spermatogénèse ont été particulièrement étudiés chez l'humain, la souris ou la drosophile (Rathke et al., 2014) mais très peu chez *C. elegans*. Bien que peu de mécanismes cellulaires et moléculaires aient été étudiés chez *C. elegans*, la cytologie de la spermatogénèse et de la fécondation sont très similaires entre les différentes espèces de nématodes. Pour cette raison, j'ai choisi de résumer l'état des connaissances sur la compaction de l'ADN en général, et de mentionner les quelques informations connues concernant les nématodes.

Pendant le processus de spermatogénèse l'ADN subit une modification importante de la structure de la chromatine. Les spermatozoïdes sont en effet beaucoup plus petits que les ovocytes, et l'ADN paternel y est donc extrêmement

compacté. Au début de la spermatogénèse, l'ADN est enroulé autour d'octamères d'histones, cependant, ils ne permettent pas une compaction maximum de celui-ci. Les 4 histones de cœur sont les histones H2A, H2B, H3 et H4, elles forment un octamère comprenant un couple de chaque histone, autour duquel l'ADN s'enroule (Talbert and Henikoff, 2010), l'histone H1 est-elle nommée histone « linker » car elle est déposée après l'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones (Kowalski and Pałyga, 2012). Ces histones possèdent certains variants et peuvent être modifiées par des méthylations ou des acétylations, rendant la chromatine plus ou moins permissive à la transcription ou à la condensation (Clarkson et al., 1999).

Au cours de la spermatogénèse, les histones seront remplacées par des « Sperm Nuclear Basic Proteines » (SNBPs) qui incluent des variants d'histones, des protéines de transitions qui effectuent la transition entre les histones et les protamines, et des protamines (Braun, 2001; Lewis et al., 2003; Miller et al., 2010). Les SNBPs ont été classés en trois catégories : histones, protamines et protamines-like (Ausió, 1999). La catégorie des Histones correspond à des histones paternelles qui ressemblent structurellement aux histones retrouvées dans les tissus somatiques. On peut retrouver ce type de SNBPs chez les échinodermes. La catégorie des protamines comprend des protéines de petite masse moléculaire, riches en arginine et très basiques, ces protamines sont retrouvées chez les vertébrés. La catégorie protamine-like consiste en des protéines basiques, riches en arginine ainsi qu'en lysine et qui ne sont pas aussi petites que les protamines, ces protamines-like sont retrouvées par exemple chez la drosophile. L'incorporation de ces protéines permet une compaction plus importante de l'ADN qu'avec les histones, de plus, ces protéines forment entre elles des ponts disulfides qui permettent le maintien de cette compaction jusqu'après la fécondation (Figure 12).





**Figure 12: La compaction de l'ADN paternel se fait grâce aux protamines. L'échange des histones par les protamines pendant la spermatogénèse permet la compaction de l'ADN grâce à un arrangement toroïdal (forme de « doughnut »). Les toroïdes sont agencés face à face les uns aux autres. Lorsque certaines parties de l'ADN sont toujours organisées autour d'histones, elles prennent une forme solénoïde et s'intercale entre les toroïdes. Figures adaptées de (Agarwal, 2014; Jenkins and Carrell, 2012)**

### 3.1.1.1 Chez les organismes modèles

Chez les mammifères des variants d'histones remplacent les histones canoniques. Puis, des protéines de transition sont incorporées avant le recrutement final des protamines (Akhmanova et al., 1997; Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005; Tanphaichitr et al., 1978; Unni et al., 1995). Après la méiose, et avant l'incorporation des protamines, 90 % des protéines de la chromatine sont des protéines de transition (Meistrich et al., 2003a). Les protéines de transition semblent être incorporées afin de rendre la molécule d'ADN plus permissive à l'incorporation des protamines en la rendant plus flexible (Akama et al., 1999; Meistrich et al., 2003b).

Chez la souris, deux protéines de transition, TP1 et TP2 sont connues, ce sont des protéines riches en arginine et en lysine qui se lient avec une forte affinité à l'ADN (Heidaran and Kistler, 1987; Kleene and Flynn, 1987; Kleene et al., 1988; Lévesque et al., 1998). Chez les souris ne possédant pas les protéines de transition, le remplacement des histones par les protamines semble se produire, mais la condensation de l'ADN est irrégulière et les mâles sont stériles (Zhao et al., 2004).

Chez la drosophile, aucun homologue des protéines de transition n'a été trouvé, cependant, la protéine Tpl94D pourrait être un bon candidat puisqu'elle est

présente sur la chromatine au moment de la transition histones-protamines (Rathke et al., 2007).

Après leur incorporation, les protéines de transition seront elles-mêmes remplacées par les protamines ou les protamines-like. Chez l'homme et la souris, deux protamines sont connues, P1 et P2 (Braun, 2001; Kleene et al., 1988; Yelick et al., 1987). L'absence de l'une ou de l'autre des protéines entraîne la stérilité des individus (Carrell et al., 2007). Chez la drosophile, deux protamines like sont connues, ProtA et ProtB, codées respectivement par les gènes Mst35Ba et Mst35Bb (Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005). Cependant, au contraire des mammifères, l'absence de ces protéines n'entraîne qu'une faible proportion de noyaux anormalement formés (Rathke et al., 2010). Ceci est sûrement dû au fait que d'autres SNBPs jouent un rôle dans la formation du noyau chez la drosophile. L'incorporation de ces protéines a lieu après que la transcription a cessé dans ces cellules, les ARNm permettant de produire ces protéines sont donc maintenus après l'arrêt de la transcription et leur traduction est initiée au moment de leur incorporation (Barckmann et al., 2013; Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005; Kleene, 2003).

Plusieurs modifications de la chromatine ont été observées et permettraient le remplacement des histones par les protamines. On peut par exemple observer une étape d'acétylation importante de l'histone H4 après la méiose et juste avant leur remplacement (Grimes and Henderson, 1984; Kurtz et al., 2007; McLay and Clarke, 2003; Pivot-Pajot et al., 2003). Il semblerait que cette hyper acétylation permette d'ouvrir la chromatine afin de faciliter le remplacement des histones par les protéines de transition (Braun, 2001; Sassone-Corsi, 2002).

Une autre modification qui pourrait permettre l'ouverture de la chromatine est l'ubiquitination (Baarends et al., 1999; Chen et al., 1998). En effet, les histones H2A et H2B sont ubiquitinylées chez la souris avant leur remplacement, la protéine RFN8 serait responsable de cette modification (Lu et al., 2010). Chez la drosophile, les sous-unités Pro $\alpha$ 3T and Pro $\alpha$ 6T du protéasome sont observées dans les spermatides après la méiose et sont spécifiques de ce tissu (Yuan et al., 1996)

Les protéines responsables de ces modifications sont peu connues, cependant ces modifications peuvent être reconnues par des « readers » responsables de la lecture des modifications de la chromatine. Par exemple, les protéines à bromodomaine sont capables de se lier aux histones acétylées (Denis et al., 2006).

Chez la souris, la protéine à bromodomaine BRDT est spécifique des cellules germinales paternelles et est associée à la chromatine durant la transition entre les histones et les protamines (Morinière et al., 2009). D'autres protéines responsables de l'élimination des histones et de l'incorporation des SNBPs sont essentielles à la reconfiguration de la chromatine et dépendantes de l'ATP (Haushalter and Kadonaga, 2003). Chez la souris, la chaperonne HSPA2 est spécifique des spermatides et se lie aux protéines de transition (Govin et al., 2006).

Chez la drosophile, la protéine tNAP est responsable de l'incorporation de la protéine MST77F (Doyen et al., 2015), la sous-unité CAF1-p75 du complexe CAF1 permet quant à elle l'incorporation des protéines MST35Ba et MS35Bb (Doyen et al., 2013), ces protéines font partie des SNBPs chez la drosophile et sont nécessaires à la compaction de l'ADN paternel. La protéine de remodelage de la chromatine ISWI est aussi responsable du transfert des SNBPs sur la chromatine, en son absence, les chaperonnes d'histones ne s'associent pas de manière stable à la chromatine et la compaction de l'ADN paternel est inhibée. Les protéines responsables de l'éviction des histones ne sont par ailleurs pas connues.

Les cassures double brin pourraient elles aussi permettre le relâchement de la chromatine et entraîner la transition histone-protamines. On observe notamment ces cassures après la méiose chez les mammifères et les drosophiles (Marcon and Boissonneault, 2004; McPherson and Longo, 1993; Rathke et al., 2007). La topoisomérase II chez la souris semblerait être responsable de ces cassures (Laberge and Boissonneault, 2005).

Chez ces organismes, le remplacement des histones est très important, leur proportion devient très faible dans les spermatozoïdes matures. Chez les humains, on n'observe environ plus que 15% d'histones sur l'ADN paternel (Gatewood et al., 1990), chez la souris seulement 1% (Balhorn et al., 1977) et chez la drosophile,

presque plus aucune histone ne semble conservée avant la fécondation (Rathke et al., 2007).

Certains variants d'histones sont spécifiquement retrouvés au niveau des centromères chez les spermatozoïdes matures, c'est le cas du variant d'histone H3 Cid chez la drosophile (Loppin et al., 2001) et de l'histone centromérique Cenp-A chez les mammifères (Palmer et al., 1990). La persistance de ces structures dépendantes des variants d'histones au niveau des régions centromériques et télomériques est considérée comme importante pour la fonction et l'organisation des chromosomes dans l'embryon (Hammoud et al., 2009; Kimura and Yanagimachi, 1995). L'absence de Cid entraîne le développement d'embryons gynogénétiques, les centromères n'étant pas correctement incorporés au fuseau mitotique lors de la première division cellulaire (Raychaudhuri et al., 2012).

### 3.1.1.2 Chez *C. elegans*

L'analyse protéomique des spermatozoïdes a permis de révéler 3 protéines, SPCH-1, SPCH-2 et SPCH-3 hautement basiques et similaires aux protamines-like des invertébrés par BLAST (Chu et al., 2006).

De plus cette analyse a permis de révéler deux variants de l'histone canonique H2A, HTAS-1 et HTZ-1, spécifiques des spermatozoïdes. Le remplacement de l'histone H2A par ces variants semble se produire grâce à son ubiquitination, permettant son élimination de l'ADN paternel. Cependant, toutes les histones H2A ne sont pas éliminées de l'ADN paternel lorsque les spermatozoïdes sont matures chez *C. elegans* (Samson et al., 2014).

Au contraire des autres espèces étudiées, L'ADN des spermatozoïdes matures de *C. elegans* semble retenir une importante proportion d'histones H2A, H3 et H4. De plus, l'incorporation de ces variants ainsi que des protamines se produit à partir du stade pachytène, alors que chez les autres espèces, elle semble se produire uniquement après la méiose (Samson et al., 2014). Chez *C. elegans*, aucune protéine de transition n'a été trouvée. Il semblerait donc que le remplacement des histones par des protamines se produise sans l'incorporation préalable de protéines de transition. Les acteurs responsables de ces modifications ne sont pas connus.

Cependant, la protéine TOP-1 a été observée durant la spermatogénèse et dans les spermatozoïdes matures, cette topoisomérase est responsable de cassures double brin et son absence entraîne des défauts de condensation de la chromatine (Chu et al., 2006). TOP-1 pourrait donc être responsables des cassures double brin permettant la relaxation de la chromatine et par conséquent la transition entre les protamines et les histones.

Chez *C. elegans*, peu d'informations sont connues concernant l'implication des modifications d'histones lors de la compaction de la chromatine. Cependant, certaines modifications ont été observées durant le processus de spermatogénèse. Avant l'étape de diakinèse, les histones subissent une acétylation importante qui pourrait permettre leur élimination, après cette étape, une déacétylation massive est observée (Samson et al., 2014). De plus, une modification de la méthylation de ces histones est observée lors de la progression méiotique.

On trouve cependant une spécificité des modifications d'histones sur le chromosome X par rapport aux autosomes (Kelly et al., 2002; Samson et al., 2014). Chez le mâle, on retrouve des marques répressives déposées en raison du silencing du chromosome sexuel, mais aussi en raison du Meiotic Silencing of Unpaired Chromosome (MSUC) (Bean et al., 2004; Rechtsteiner et al., 2010). En effet, le chromosome X, au contraire des autosomes, est transcriptionnellement inactif pendant la méiose et les mâles ne possèdent qu'un seul chromosome X qui ne sera donc apparié avec aucun autre chromosome durant la méiose. Pour cela, les marques répressives (par exemple H3K9me) sont présentes sur ce chromosomes et les marques activatrices (par exemple H3K4me ainsi que H3K36me) en sont absentes. La marque répressive H3K9me<sub>2</sub> est quant à elle observée seulement sur le chromosome X des mâles et non celui des hermaphrodites, qui elles possèdent deux chromosomes X. Il semblerait donc que cette marque soit déposée en raison de l'absence de pairing de ce chromosome et non à cause de son identité « chromosome sexuel » (Samson et al., 2014).

La répression de chromosomes non appariés n'est pas observée seulement chez *C. elegans*, par exemple, les chromosome X et Y des souris mâles ne possèdent pas une synapse complète, et on retrouve un enrichissement similaire en H3K9me<sub>2</sub>

durant la méiose au niveau de ces chromosomes (Cowell et al., 2002; Turner et al., 2005).

### 3.1.2 La transcription durant le processus de spermatogénèse

Chez les mammifères, on observe un pic de transcription après la méiose, les ARNm sont stockés et ceci permettrait aux spermatozoïdes de préparer la phase de condensation et de restructuration de la chromatine (Barckmann et al., 2013; Steger, 1999). Chez *C. elegans*, ce pic de transcription n'est pas observé, ceci est sûrement dû au fait que la restructuration de la chromatine se fait pendant la méiose et qu'elle entraîne la répression de la transcription. Cependant, même s'il a été longtemps considéré que la seule contribution du spermatozoïde à l'ovocyte consistait en la transmission de l'ADN paternel et des centrioles, il a été montré qu'au contraire, les spermatozoïdes apportent des protéines, des ARNm et des ARN non codants chez de nombreux organismes, comme chez *C. elegans* (Ma et al., 2014; Miller, 2007; Miller and Ostermeier, 2006). Ces ARN ne sont pas seulement spécifiques du fonctionnement des spermatozoïdes mais possèdent des fonctions potentielles durant l'embryogénèse (Bayer et al., 2009; Liu et al., 2012; Ma et al., 2014; Rassoulzadegan et al., 2006). Une étude a montré que 10% des ARN de l'embryon de *C. elegans* proviennent des ARN transportés par le spermatozoïde. De plus, cette étude a montré que certains ARN pouvaient correspondre à des enzymes impliquées dans des voies métaboliques. Le spermatozoïde pourrait donc apporter les enzymes nécessaires à la reprise du cycle cellulaire après la fécondation (Stoeckius et al., 2014). Il a par ailleurs été montré que la privation de nourriture chez les mâles de *C. elegans* et des rongeurs a un effet sur le métabolisme de leur descendance, cette mémoire pourrait être transmise de manière épigénétique via l'apport d'ARN lors de la fécondation (Anderson et al., 2006; Miersch and Döring, 2012; Ng et al., 2010).

## 3.2 Les étapes suivant la fécondation

Après la fécondation, la chromatine paternelle, les mitochondries et les FB-MOs sont retrouvés dans le cytoplasme de l'ovocyte. Les mitochondries et les FB-MOs sont activement détruits après la fécondation (Politi et al., 2014). Chez *C. elegans* comme chez la drosophile, la voie de l'autophagie, via les lysosomes est impliquée dans ce processus (Rawi et al., 2011). Durant la décondensation de l'ADN paternel, les centrosomes apportés par les spermatozoïdes se dupliquent, après la formation de l'enveloppe nucléaire, les centrosomes s'attacheront à la membrane externe (Meyerzon et al., 2009). Des microtubules seront nucléés à partir de ces centrosomes et permettront l'attraction du pronoyau femelle (Reinsch and Gönczy, 1998). Après la rencontre des pronoyaux, leurs membranes seront détruites et le zygote subira la première division de mitose.

### 3.2.1 L'élimination des SNBPs et l'incorporation des histones maternelles

Après la fécondation et l'activation de l'ovocyte, l'élimination des SNBPs et leur remplacement par des histones maternelles semblent être le processus le plus précoce du développement embryonnaire.

Chez la drosophile, quatre SNBPs ont été identifiés, Mst35a, Mst35b, Mst77F et Prtl99C, elles sont impliquées dans la formation de ponts disulfides, comme les protamines P1 et P2 des mammifères (Rathke et al., 2007). Ces ponts disulfides permettent une compaction importante de la chromatine ainsi que sa stabilisation (Balhorn, 2007). Ces ponts doivent donc être détruits après la fécondation afin de faciliter le processus de remplacement des SNBPs par les histones maternelles (Perreault et al., 1984). Ceci implique qu'une ou plusieurs enzymes spécialisées doivent être stockées dans l'ovocyte avant la fécondation. L'utilisation d'un agent réducteur des ponts disulfides permet notamment de décondenser l'ADN paternel in vitro (Incharoensakdi and Panyim, 1981). De plus, chez le hamster, plus l'ADN paternel contient de ponts disulfides, plus la durée de décondensation de cet ADN est longue (Perreault et al., 1987).

Le traitement d'embryons d'hamster avec de l'antymicin A entraîne une absence de décondensation de l'ADN paternel, suggérant qu'un mécanisme ATP-dépendant est nécessaire pour le remplacement des histones (Wright and Longo,

1988). Chez la drosophile, une enzyme maternelle nécessaire à la décompaction de l'ADN paternel a été identifiée. Il s'agit de la thioredoxine Deadhead, exprimée fortement dans les ovocytes, qui réduit les ponts disulfides. Chez les mutants *dhd*, l'ADN paternel n'est pas correctement décondensé et il ne participe pas au développement embryonnaire (Tirmarche et al., 2016). Chez les mammifères, l'effet direct de l'antioxydant glutathion n'a pas encore été démontré mais il est nécessaire à la décondensation de l'ADN paternel (Perreault et al., 1988; Sutovsky and Schatten, 1997).

Après la réduction des ponts disulfides, les SNBPs doivent être éliminés de l'ADN paternel afin que les histones maternelles les remplacent. En plus de son rôle dans le dépôt des SNBPs lors de la condensation de l'ADN paternel, la protéine ISWI semble aussi jouer un rôle dans leur élimination après la fécondation chez la drosophile, en son absence, l'ADN paternel ne se décondense pas, bien que l'incorporation d'histones maternelles soit observée (Doyen et al., 2015). Chez l'homme, la protéine TAF-1 pourrait être responsable de cette élimination, elle est capable de se lier aux SNBPs et joue un rôle dans la décondensation de l'ADN paternel *in vitro* (Matsumoto et al., 1999).

Les histones maternelles qui remplacent les SNBPs sont associées en complexes appelés nucléosomes, leur assemblage est généralement dépendant de la réplication mais ici, cet assemblage a lieu avant la réplication de l'ADN paternel (Horard and Loppin, 2015; Orsi et al., 2009). Les histones sont déposées grâce à des chaperonnes d'histone sur l'ADN. Chaque chaperonne semble avoir une préférence pour les couples d'histones H2A/H2B ou H3/H4 (Haushalter and Kadonaga, 2003; Loyola and Almouzni, 2004).

Chez les mammifères, le complexe responsable du dépôt du couple d'histone H3.3/H4 comporte les protéines HIRA, Ubinuclein 1 et Cabin 1 (Szenker et al., 2011). La drosophile ne semble pas posséder de protéine Cabin 1 mais possède la protéine HIRA et une protéine semblant correspondre à Ubinuclein 1. Cette protéine est la protéine Yemanuclein (YEM) et est indispensable à l'assemblage des nucléosomes sur la chromatine (Aït-Ahmed et al., 1992; Orsi et al., 2013).

Les femelles drosophiles mutées pour la protéine HIRA produisent des embryons dépourvus d'histones maternelles. Lorsque ces embryons sont fécondés,



l'ADN paternel ne se décondense pas et l'embryon se développe seulement avec l'ADN maternel (Loppin et al., 2001). HIRA est une chaperonne d'histones qui permet de stocker et de déposer les histones maternelles indépendamment de la réplication sur la chromatine paternelle. Chez la drosophile, deux chaperonnes d'histones indépendantes de la réplication ont été identifiées, le complexe HIRA qui dépose H3.3/H4 au niveau des régions géniques (Ray-Gallet et al., 2002; Tagami et al., 2004) et le complexe ATRX/DAXX qui dépose H3.3/H4 au niveau des régions répétées du génome, dont les centromères (Drané et al., 2010; Fromental-Ramain et al., 2017; Goldberg et al., 2010a; Voon and Wong, 2016).

Il a par ailleurs été montré que la protéine ASF-1 permet de délivrer les histones maternelles aux protéines HIRA et YEM qui se localiseront au niveau de l'ADN paternel lors de sa décondensation (Horard et al., 2018). L'absence des protéines ASF-1, HIRA ou YEM entraîne l'absence de décondensation de l'ADN paternel et le développement d'un zygote haploïde seulement avec l'ADN maternel. La décondensation de l'ADN paternel est aussi dépendante de la protéine CHD1 impliquée dans le glissement des nucléosomes le long de l'ADN (Konev et al., 2007). Chez les mutants *chd1*, l'ADN paternel semble mal se décondenser et le pronoyau mâle présente des formes variables.

La protéine chaperonne CAF-1 responsable de l'assemblage des nucléosomes lors de la réplication, à été étudiée chez la drosophile, comme chez *C. elegans* (Shibahara and Stillman, 1999). L'assemblage des nucléosomes via CAF-1 implique l'histone H3 et non son variant H3.3. Lors de sa décondensation, l'ADN paternel comporte donc le variant d'histone H3.3.

Chez le Xénope, le complexe N1/N2 est responsable de la prise en charge des histones H3/H4, la nucléoplasmine des histone H2A/H2B (Frehlick et al., 2006; Kleinschmidt et al., 1985) et la protéine NAP-1 est responsable du dépôt de l'histone "linker" (Chang et al., 1997; Ito et al., 1996; Shintomi et al., 2005). La nucléoplasmine est une chaperonne d'histone très abondante dans l'ovocyte capable de décondenser l'ADN paternel in vitro. Il semblerait qu'en plus de déposer les histones maternelles sur l'ADN paternel, elle puisse avoir un rôle dans l'élimination des SNBPs de la chromatine après la réduction des ponts disulfides (Finn et al., 2012; Frehlick et al., 2006; Philpott et al., 1991). Chez l'humain et la drosophile la protéine NAP-1 est

responsable du dépôt des histones H2A/H2B sur la chromatine paternelle (Ishimi et al., 1984; Ito et al., 1996).

Chez *C. elegans*, les étapes de la décondensation de l'ADN paternel ne sont pas connues. Il a seulement été montré que le variant d'histone H3.3 qui est présent sur l'ADN paternel avant la fécondation, est éliminé de l'ADN paternel mais aussi maternel après la fécondation, avant d'être de nouveau associé à la chromatine après la formation de la membrane nucléaire (Ooi et al., 2006).

### 3.2.2 La formation d'un pronoyau male

Lors de l'élimination des SNBPs et l'incorporation des histones maternels, la membrane nucléaire se forme et l'ADN paternel se réplique. Chez *C. elegans*, l'enveloppe nucléaire est reformée après la fin des deux divisions de méiose femelle (Gorjánác et al., 2007a). L'enveloppe nucléaire est composé d'une membrane interne (INM) et d'une membrane externe (ONM) toutes deux jointes par des complexes de pores nucléaires (NPCs) (Galy et al., 2003). La membrane interne est tapissée par des filaments de lamines formant la lamina, de plus elle comprend des protéines membranaires (LEM) elles-mêmes en interaction avec la lamina ou avec les chromosomes. La lamina fournit un cytosquelette nucléaire en interagissant avec les NPCs et l'INM et permet de stabiliser l'enveloppe nucléaire. Chez *C. elegans*, un seul gène de lamine existe. Les lamines interagissent notamment avec des protéines de l'INM elles-mêmes possédant des domaines de liaisons à l'actine et aux microtubules (Gruenbaum et al., 2005). Ces interactions permettent donc au pronoyau de se déplacer dans la cellule (Starr and Han, 2003; Wilhelmsen et al., 2006). Les lamines interagissent notamment avec les protéines LEM. Chez *C. elegans*, trois LEM ont été identifiées, LEM-2, LEM-3 et Emerin (Lee et al., 2000; Lin et al., 2000).. La protéine BAF-1 est une protéine de liaison à l'ADN décondensé, il a notamment été montrée qu'elle était capable de se lier aussi aux protéines LEM et son absence empêche la formation de l'enveloppe nucléaire (Gorjánác et al., 2007b). In vitro, un excès de BAF entraine l'hyper condensation de la chromatine et empêche la formation de l'enveloppe nucléaire (Segura-Totten et al., 2002). In vivo, l'observation de ce phénotype est possible lors de la déplétion de BAF-1 chez *C.*

*elegans* et *D. melanogaster* suggérant que la décondensation de l'ADN et la formation de l'enveloppe nucléaire sont des processus couplés via leur interaction (Furukawa et al., 2003; Zheng et al., 2000).

Après la formation du pronoyau, les centrosomes s'y attacheront, les microtubules polymériseront et rejoindront le pronoyau femelle qui sera transporté au pronoyau mâle. La rencontre des pronoyaux permettra ensuite aux chromosomes paternels et maternels de subir la première mitose du zygote. Chez les mutants du complexe SUN/KASH, l'attachement des centrosomes à la membrane nucléaire paternelle est inhibé. La nucléation des microtubules étant découplée de la présence du pronoyau mâle, le pronoyau femelle peut migrer vers les centrosomes paternels dans ces mutants. En conséquence, un fuseau mitotique se forme et incorpore les chromosomes paternels ou maternels en fonction de leur proximité avec les centrosomes dans la cellule (Malone et al., 2003)

#### **4. Le déterminisme du sexe**

La reproduction chez la plupart des organismes sexués implique la production de gamètes de différentes tailles (anisogamie) entre les mâles et les femelles. Le déterminisme du sexe permet de déterminer quel type de gamètes (spermatozoïdes ou ovocyte) un individu produira. Ce déterminisme est très conservé chez les espèces sexuées, mais les processus moléculaires et développementaux qui permettent de le mettre en place sont très divers en fonction des espèces (Bull, 1985; Charlesworth, 1996). L'anisogamie n'implique pas forcément des sexes séparés et peut aussi être rencontré chez les hermaphrodites. Les hermaphrodites de *C. elegans* produisent par exemple à la fois des spermatozoïdes de petites tailles et des ovocytes de grandes tailles.

Le déterminisme du sexe peut être génotypique (dépendant d'un ou plusieurs locus chromosomiques) ou environnemental (dépendant des facteurs environnementaux lors du développement embryonnaire), ou bien être régulé par une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (Bachtrog et al., 2014) (Figure 15).

Le déterminisme du sexe permet donc de définir quel type de gamètes le futur individu produira, mais participe aussi chez les espèces avec des sexes distincts à la différenciation sexuelle. Les individus, en plus de produire des gamètes différents, auront alors des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et comportementales différentes qu'ils soient mâle ou femelle. Certains caractères sexuels sont notamment nécessaires pour la reproduction où apportent une meilleure fitness aux individus.

#### **4.1 Le déterminisme génotypique du sexe**

Le déterminisme génétique comprend les types de déterminismes pour lequel un facteur génétique est le principal signal déterminant le sexe.

##### **4.1.1 Le déterminisme chromosomique**

Plusieurs types de déterminismes chromosomiques existent chez les animaux. Ce déterminisme est porté par les chromosomes sexuels. Un individu est hétérogamétique s'il est hétérozygote pour le ou les locus du déterminisme du sexe. On peut rencontrer des espèces chez qui les mâles sont hétérogamétiques puisqu'ils portent les chromosomes sexuels X et Y, alors que les femelles sont XX. Lorsque les femelles sont hétérogamétiques, on parle de chromosomes sexuels ZW pour les femelles et ZZ pour les mâles. Pratiquement tous les mammifères, plusieurs espèces de diptères et quelques espèces de poisson présentent une hétérogamétie mâle. Tandis que les oiseaux, les serpents et les papillons ont une hétérogamétie femelle (Gamble and Zarkower, 2012). Chez les amphibiens, on rencontre les deux types d'hétérogamétie (mâle et femelle) selon les espèces (Nakamura, 2009).

On peut aussi retrouver des espèces chez qui un des individus aura deux chromosomes sexuels tandis que l'autre n'en aura qu'un seul, c'est le cas de *C. elegans* chez qui les hermaphrodites ont deux chromosomes X et les mâles un seul (Zarkower, 2006).

Le développement sexuel est déterminé à partir d'une région majeure de déterminisme qui déclenche une cascade de gènes spécifiques du sexe, contrôlant ainsi le développement des individus en mâle ou en femelle (Gamble and Zarkower, 2012).

Chez les mammifères, ce rôle est attribué au locus dominant *sry* (sex-determining region on Y). SRY est un régulateur transcriptionnel qui inhibe la voie Wnt/ $\beta$ -catenin promouvant le développement femelle. Cette inhibition permet l'expression du gène Sry-box 9 (*Sox9*) dont l'activité est nécessaire pour le développement mâle (Eggers and Sinclair, 2012; Ono and Harley, 2013).

Chez *D. melanogaster*, le sexe est déterminé en fonction du ratio de chromosome X sur les autosomes (X:A ratio). Un embryon XX exprimera le facteur d'épissage *Sxl* (Sex-lethal) qui permettra de produire l'isoforme femelle spécifique de *dsx* (doublesex) par une cascade d'épissage d'ARNm. Un embryon XY exprimera *Sxl* en plus faible proportion produisant l'isoforme mâle spécifique de *Dsx*. Le chromosome Y chez *D. melanogaster* ne contient pas de gène de déterminisme du sexe mais des gènes requis pour la fertilité des mâles. En raison du ratio X:A, un individu X0 sera donc mâle, mais en l'absence du chromosome Y, ce mâle sera stérile (Gilbert, 2000).

Chez *C. elegans*, le déterminisme du sexe est aussi déclenché par le ratio X:A mais les mâles ne possèdent pas de chromosome Y. Un ratio égal à 0,5 (individu X0) entrainera l'activation du gène *xol-1* (X0 lethal) et par une cascade d'inhibition, une faible expression du facteur de transcription *tra-1* et un développement en mâle. Un ratio X:A égal à 1 (individu XX) empêchera l'activation du gène *xol-1* et par la même cascade une forte expression de *tra-1* et le développement en hermaphrodite (Zarkower, 2006).

La théorie concernant l'évolution des chromosomes sexuels propose que les chromosomes sexuels étaient auparavant une paire d'autosomes homologues (Abbott et al., 2017) (Figure 13A). Ces autosomes ont gagné une fonction de déterminisme du sexe régulée par un ou plusieurs loci (Figure 13B). Par la suite, plusieurs loci spécifiques du sexe se sont organisés autour du locus du déterminisme entraînant la suppression de la recombinaison avec l'autre chromosome homologue,

la transmission simultanée de ces loci étant largement avantageuse (Figure 13C). L'absence de recombinaison peut s'étendre par le gain de gènes sexuels antagonistes (gènes bénéfiques pour un sexe mais pas pour l'autre). En fonction des espèces, le degré de différenciation entre les chromosomes sexuels varie grandement. Les chromosomes sexuels ont souvent un taux de recombinaison réduit, un contenu spécifique en gènes, un mécanisme de compensation de dose et une taille différente par rapport à leur homologue (Bachtrog, 2013; Gamble and Zarkower, 2012) (Figure 13E).

Certaines espèces possèdent des chromosomes sexuels homomorphiques, capables de recombiner et présentant peu de différences au niveau des gènes portés. C'est le cas des chromosomes sexuels de l'espèce de poisson *Oryzias latipes* où la partie mâle-spécifique du génome représente seulement 1% du chromosome sexuel (Matsuda et al., 2002; Takehana et al., 2007). Au contraire, certaines espèces comme l'humain ou la drosophile possèdent un chromosome Y très ancien ayant acquis de nombreuses séquences répétées ainsi que de nombreux gènes spécifiques. Chez ces espèces, la recombinaison avec le chromosome X ne se produit plus qu'au niveau de région pseudoautosomales (les régions PAR) (Otto et al., 2011) (Figure 13F et Figure 14).

L'absence de recombinaison du chromosome Y entraîne l'accumulation de mutations délétères ainsi que l'accumulation de séquences répétées et de duplications. Ces modifications entraînent un changement morphologique du chromosome sexuel par rapport au chromosome homologue. Il est considéré que les espèces XX/X0 aurait évolué à partir d'espèces XX/XY chez qui le chromosome Y aurait dégénéré puis disparu (Charlesworth and Charlesworth, 2000)

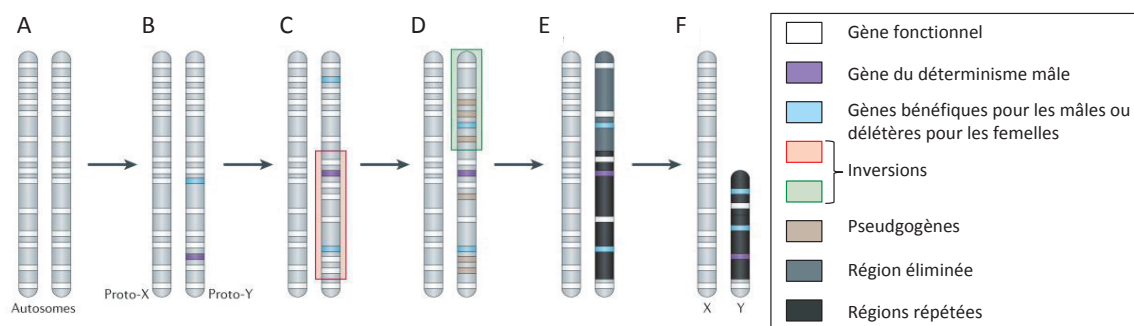


Figure 13: Modèle d'évolution du chromosome Y.

(A) Les chromosomes sexuels sont formés à partir d'autosomes qui contiennent les mêmes gènes. (B) Acquisition d'un gène du déterminisme du sexe mâle. (C) Accumulation de gènes sexuels antagonistes proches de la région du déterminisme du sexe. Cette accumulation peut entraîner l'absence de recombinaison entre ces régions et le chromosome X. L'absence de recombinaison peut entraîner des inversions. (D) L'absence de recombinaison peut entraîner l'accumulation de mutations « perte de fonction » liées au gène spécifique du Y (pseudogènes). (E) Accumulation de régions répétées. Cette accumulation entraîne la production de régions non fonctionnelles qui peuvent être éliminées (région éliminée). (F) Les chromosomes sexuels ne partagent plus la même taille ni les mêmes séquences et ne recombinent plus qu'au niveau de régions restreintes. Dans ce cas, le chromosome X est similaire à l'autosome dont il provient alors que le chromosome Y a perdu de nombreux gènes ancestraux et a accumulé des régions répétées. Figure adaptée de (Bachtrog, 2013)

Chez les mammifères et la drosophile, les chromosomes X et Y sont très divergents, les femelles possèdent alors deux copies des gènes portés par le chromosome X et les mâles une seule. Afin de compenser cet effet de dose, un mécanisme de compensation est mis en place. Chez les mammifères, un des chromosomes X est inactivé chez les femelles alors que chez les drosophiles, le chromosome X est surexprimé chez les mâles (Brockdorff and Turner, 2015; Lucchesi and Kuroda, 2015). Chez *C. elegans*, les deux chromosomes X des hermaphrodites sont actifs mais leur niveau de transcription est diminué de moitié par rapport aux autosomes (Meyer, 2005).

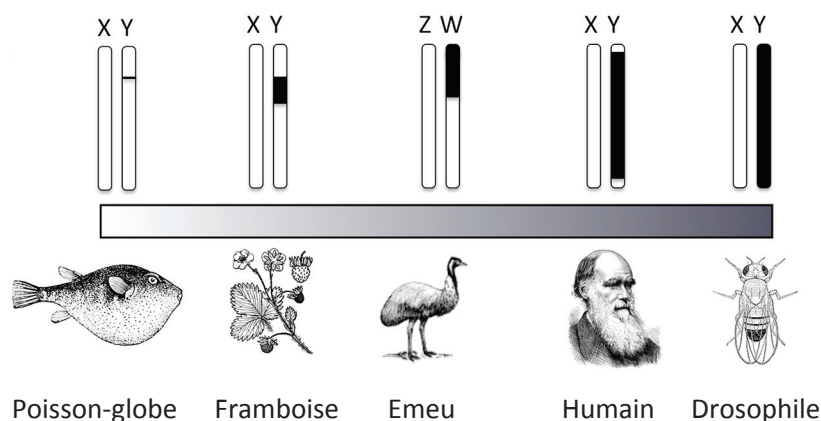


Figure 14: Le degré de différenciation des chromosomes sexuels varie grandement entre les espèces.

Les régions spécifiques du chromosome Y sont indiquées en noir, celles partagées par les deux chromosomes sont blanches. Le chromosome Y du poisson globe ne varie du chromosome X que par la présence d'un locus de déterminisme du sexe, chez l'humain les chromosomes X et Y ne sont plus similaires qu'au niveau des régions PAR qui sont le lieu de la recombinaison tandis que chez la drosophile les deux chromosomes ne partagent aucune région en commun (Il n'y a pas de

recombinaison pendant la méiose chez les drosophiles mâles). La taille du chromosome Y n'est pas à l'échelle. Figure adaptée de (Bachtrog et al., 2014)

#### 4.1.2 L'haplo-diploïdie

De nombreux arthropodes incluant les tiques, les mites, certains scarabées et tous les hyménoptères ont un déterminisme du sexe dépendant de la ploïdie de l'organisme. Chez ces espèces, les femelles sont diploïdes, tandis que les mâles sont haploïdes. Les mâles héritent donc d'une moitié aléatoire du génome maternel, et les femelles de la moitié du génome paternel et maternel. Ce type de système rend un déterminisme chromosomique impossible (Beye et al., 2003; Bull, 1985; Cook, 1993; Crozier, 1971).

Plus de 60 espèces d'hyménoptères possèdent un déterminisme du sexe basé sur la composition allélique d'un locus nommé Complementary Sex Determination (CSD) (van Wilgenburg et al., 2006) Les individus hétérozygotes pour ce locus se développent en femelles tandis que l'homozygotie entraîne le développement en mâle. L'absence de fécondation entraîne l'hémyzigotie de l'individu et donc son développement en mâle. L'espèce de guêpe *Apis mellifera* possède un déterminisme dépendant de ce système. Chez cette espèce, on retrouve 19 allèles différents pour le locus CSD (Beye et al., 2003). Dans ce cas, si les deux gamètes mâle et femelle portent le même allèle, alors le zygote sera homozygote pour le locus et se développera en mâle, ce système permet donc l'apparition de mâles diploïdes. Avec 19 allèles, 171 combinaisons hétérozygotes sont possibles, alors que seulement 19 homozygotes le sont. Cependant, les œufs fécondés sont pondus à un endroit différent des œufs non fécondés. Les mâles provenant d'œufs fécondés se développent donc au milieu de nombreuses femelles et seront mangés par elles peu après leur éclosion. Ainsi, chez cette espèce, le développement de mâles diploïdes est possible mais leur viabilité est compromise, aboutissant à une population adulte de femelles diploïdes et de mâles haploïdes.

Chez l'espèce de guêpe *Nasonia vitripennis*, les mâles proviennent toujours d'œufs non fécondés tandis que les femelles proviennent toujours d'œufs fécondés. Contrairement aux autres espèces d'hyménoptères, aucun mâle ne se développe



lorsque la fécondation a eu lieu, il existe donc un autre mécanisme ne dépendant pas du système de Complementary Sex Determination (Beukeboom et al., 2007). Il semblerait que le génome maternel chez cette espèce porte une empreinte génétique. Ainsi, le gène *Nvtra* maternel est réprimé lorsque l'embryon n'est pas fécondé alors que la fécondation permet de lever cette répression. Le facteur Won, dont l'action n'a pas encore été déterminée, est réprimé sur le génome femelle alors qu'il ne l'est pas chez le génome mâle. La présence de Won non réprimé lors de la fécondation permet l'activation de *Nvtra* pour les locus maternel et paternel. L'ARNm *Nvtra* est traduit seulement dans les embryons fécondés, permettant le maintien de la protéine *Nvtra* et son propre épissage. La protéine *Nvtra* est responsable par la suite de l'activation de la cascade de signalisation pour le déterminisme femelle (Verhulst et al., 2013).

## 4.2 Le déterminisme environnemental

Chez certaines espèces, le sexe est déterminé en fonction de stimuli environnementaux. Dans ce cas, il n'existe pas de différence génétique entre les sexes.

Chez les reptiles et quelques espèces de poissons, le sexe est déterminé en fonction de la température d'incubation des œufs (Janzen and Paukstis, 1991; Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008). Par exemple, l'espèce de poisson *Odontheistes bonariensis* présente 50% de femelles et 50% de mâles à 24,2°C, puis 73% de mâles lorsque cette température augmente de 1,5°C, et 98% lorsqu'elle augmente de 4.5°C (Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008). Chez ces espèces, le taux d'estrogènes durant le développement détermine le type de gonade mâle ou femelle. Ainsi, en fonction des espèces, plusieurs gènes impliqués dans la production d'estrogènes ou la signalisation à l'estrogène ont une expression variable en fonction de la température (Rhen and Schroeder, 2010).

Chez les cirripèdes (crustacés marins) le sexe dépend du photopériodisme. L'espèce *Heterosaccus lunatus* est sensible aux cycles été-hiver correspondant respectivement à une plus grande période de jour ou de nuit. Lorsque les individus

sont exposés à une plus grande période de jour, durant leur développement larvaire, on peut observer une population avec une majorité de mâles, et inversement, lorsqu'ils sont exposés à une plus grande période de nuit, on observe une majorité de femelles (Walker, 2005).

Chez certains poissons et mollusques, le sexe est déterminé en fonction de facteurs sociaux (Kobayashi et al., 2013; Warner et al., 1996). Le poisson clown vit en petit groupe comprenant un couple reproducteur et quelques animaux non reproducteurs (Elliott and Mariscal, 2001). La femelle est l'individu possédant la plus grande taille dans le groupe, le mâle est le deuxième individu en terme de taille et les individus non reproducteurs sont encore de plus petite taille (Hattori, 2001). La mort de la femelle entraîne un changement de sexe chez le mâle qui devient la femelle, et chez le plus grand non-reproducteur qui devient le mâle (Fricke and Fricke, 1977). Les mâles et les non-reproducteurs possèdent des gonades avec des tissus mâles matures et des tissus femelles immatures alors que la femelle ne possède que des tissus femelles. Durant le changement de sexe, le tissu mâle dégénère et le tissu femelle se développe (Godwin, 1994; Nakamura et al., 2015).

### **4.3 Le déterminisme mixte**

Le déterminisme environnemental et le déterminisme génétique peuvent coexister chez certaines espèces, par exemple, les espèces de lézards *Pogona vitticeps* et *Bassiana duperreyi* possèdent respectivement un système chromosomique ZZ/ZW et XX/XY mais le déterminisme génétique peut être supplanté en cas d'incubation des œufs à des températures extrêmes. Dans ce cas, on peut observer des femelles *Pogona vitticeps* ZZ et des mâles *Bassiana duperreyi* XX (Quinn et al., 2009).

Chez toutes les espèces de poissons pour laquelle la température a un effet, il a été montré que plus de mâles étaient produits lors de l'élévation de la température (Ospina-Álvarez and Piferrer, 2008). Cette augmentation de la température est notamment corrélée à une baisse de l'expression de l'aromatase cyp19a, l'enzyme impliquée dans la conversion des androgènes en œstrogènes

durant le développement de la gonade (Guiguen et al., 2010). Le ratio d'hormones mâle et femelle permet le développement de la gonade en gonade mâle ou femelle. Chez le bar commun il a été montré que la baisse d'expression de cette enzyme était due à l'augmentation de la méthylation de son promoteur (Navarro-Martín et al., 2011). Chez cette espèce, le sexe est déterminé génétiquement et la température apporte une variation dans ce déterminisme. Les températures élevées entraîne donc l'apparition de mâles qui ont un déterminisme génétique femelle, sans effet sur leur survie.

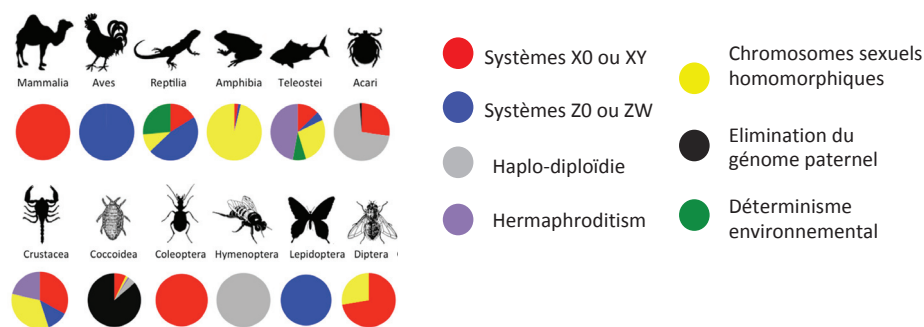


Figure 15: Représentation de la diversité des déterminismes du sexe parmi les animaux. Figure adaptée de (Bachtrog et al., 2014)

#### 4.4 La transmission des chromosomes sexuels

Les espèces sexuées présentent le plus souvent un ratio entre les femelles et les mâles (sex ratio) égal à 1. Le maintien d'un tel sex ratio a été théorisé par Fisher (Fisher, 1930). Il explique que dans une population où le sex ratio est biaisé vers une majorité de l'un ou de l'autre sexe, les parents produisant une descendance du sexe le moins représenté seront favorisés. Si une majorité de femelles est présente, alors les mâles auront accès à plus de partenaires chacun, donnant aux parents produisant ces mâles une plus grande fitness. Ceci entraînera une production progressivement plus importante de mâles au cours du temps et finalement un sex ratio égal à 1. De cette façon, la fitness des mâles et des femelles dans la population est la plus grande lorsque le sex ratio est maintenu autour de 1.

Cependant, de nombreux cas d'espèces présentant un sex ratio biaisé vers l'un ou l'autre sexe sont observés à l'état naturel. Ce biais peut intervenir lorsque

l'investissement est plus important pour les parents quand ils produisent un individu d'un sexe plutôt qu'un individu de l'autre sexe. Si la production d'individu d'un sexe entraîne une plus grande fitness pour les parents, alors un excès de production d'individus de ce sexe peut être observé, ce processus est nommé Local Resource Enhancement. C'est le cas du chien sauvage *Lycaon pictus* où les jeunes mâles apportent une plus grande aide que les femelles pour l'éducation des petits. Chez cette espèce, on observe un sex ratio biaisé en faveur des mâles (McNutt and Silk, 2008).

Dans un autre cas, si la compétition pour les ressources ou pour la reproduction est plus importante pour un sexe, alors la production de descendants de l'autre sexe sera favorisée. Dans le cas d'une compétition entre frères pour l'accès à la reproduction appelée Local Mate Competition, on observe plus de femelles dans la population. La guêpe *Pegoscapus tonduzi* pond ses œufs dans les figues de l'arbre *Ficus citrifolia*. Les mâles de cette espèce ne possèdent pas d'ailes, à la fin de leur développement, ils resteront donc au sein du fruit pour y trouver des partenaires femelles. Après la copulation, les femelles sont elles capables de se déplacer vers un autre fruit pour y déposer leurs œufs. L'absence de possibilité pour les mâles de chercher une partenaire ailleurs que dans le fruit où ils ont été pondus entraîne une compétition entre les frères pour l'accès à la reproduction. Ce phénomène entraîne un sex ratio biaisé en faveur des femelles (Pereira and Prado, 2006).

De plus, l'ajustement du sex ratio peut parfois être induit par erreur, ce sex ratio ne sera alors pas adapté pour la population. C'est le cas de la crevette *Artemia franciscana*, cette espèce est gonochorique et possède en temps normal un sex ratio égal à 1 (Lievens et al., 2016). Cependant, lors de l'invasion de son habitat par l'espèce *Artemia parthenogenetica*, son sex ratio est biaisé avec une majorité de mâles. En effet, l'espèce *Artemia parthenogenetica* n'est composée que de femelles qui ne sont pas reconnues comme des femelles d'une autre espèce par les individus de l'espèce *A. franciscana*. En réponse à cette invasion, les individus de l'espèce *A. franciscana* produisent plus de mâles.

Chez les espèces sexuées, la transmission des chromosomes sexuels devrait être égale grâce à la méiose. Chez une espèce au déterminisme XX/XY, la moitié des individus devraient donc recevoir un chromosome X et devenir des femelles, l'autre moitié devrait recevoir un chromosome Y et devenir des mâles. Dans ce cas, l'observation de sex ratio biaisée semble paradoxale. Ceci peut être dû à divers mécanismes cellulaires comme le « meiotic drive » ou l'infection par une bactérie.

#### 4.4.1 Le meiotic drive

La méiose femelle est asymétrique, une seule cellule des quatre cellules haploïdes produites par ce processus deviendra un ovocyte. La répartition des chromatides dans les ovocytes produits par une femelle devrait donc être aléatoire avec une chance sur 4 pour une chromatide d'être contenue dans le futur ovocyte. Cependant, certains locus peuvent biaiser leur propre ségrégation afin d'être transmis plus souvent à la descendance (Lindholm et al., 2016).

Les mâles aussi peuvent posséder des locus avec un meiotic drive, dans ce cas le processus peut se produire avant ou après la méiose et implique la maturation ou la fonction des spermatozoïdes qui ne contiennent pas ce locus (Lindholm et al., 2016).

Ce processus peut affecter des locus impliqués dans le déterminisme du sexe et ainsi entraîner un biais dans le sex ratio d'une espèce. C'est le cas de l'espèce du nématode *Auanema rhodensis* où seulement 5% de mâles sont présents dans la population. Dans cette espèce, les femelles sont XX et les mâles XO comme chez *C. elegans*. Chez les mâles, les chromatides sœurs de l'unique chromosome X sont séparées durant la première division de méiose au lieu de rester cohésives, chaque spermatocyte secondaire reçoit donc une chromatide du chromosome X. Lors de la deuxième division, une seule spermatide recevra cette unique chromatide. Durant cette division, la spermatide recevant le chromosome X reçoit aussi les composants cellulaires nécessaires à la maturation du spermatozoïde tandis que l'autre reçoit les composants non essentiels normalement retrouvés dans le corps résiduel. Parmi les composants essentiels, on retrouve notamment les protéines MSP qui permettront

la motilité du futur spermatozoïde. Ainsi, la majorité des ovocytes reçoit un spermatozoïde portant le chromosome X et se développera donc en femelle. Ce meiotic drive entraîne donc un sex ratio biaisé en faveur des femelles chez cette espèce (Shakes et al., 2011) (Figure 16).

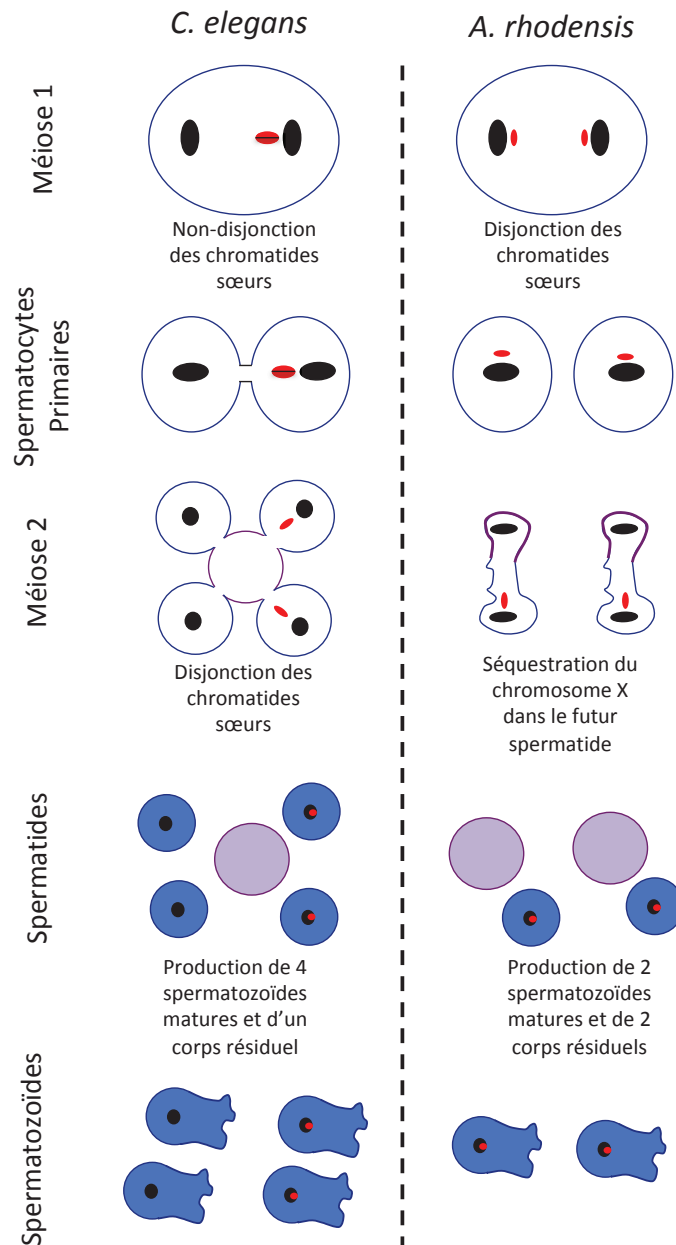


Figure 16: Comparaison de la ségrégation du chromosome X chez les mâles des espèces *C. elegans* et *A. rhodensis*.

Les autosomes sont en noir et le chromosome X en rouge, tous les individus possèdent une paire de chaque autosome et un seul chromosome X (un chromosome X à deux chromatides est symbolisé par un trait noir séparant la structure rouge). Les spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes sont en bleu et les corps résiduels en violet. Les spermatides recevant MSP sont colorés en bleu. (A) Chez les mâles de *C. elegans* l'unique chromosome X à deux chromatides est séquestré dans une des deux cellules à la fin de la méiose 1, puis les chromatides sœurs du chromosome X sont

ségrégées dans deux cellules différentes durant la méiose 2. Ce phénomène aboutit à la production de 2 spermatozoïdes possédant une chromatide du chromosome X et 2 spermatozoïdes ne possédant pas d'exemplaire du chromosome X. Tous les spermatozoïdes sont fertiles. (B) Chez *A. rhodensis*, durant l'anaphase de méiose 1, chaque chromatide sœur de l'unique chromosome X est ségréguée dans une cellule issue de la méiose 1, tandis que pour les autosomes ce sont les chromosomes de chaque bivalent qui le sont. Durant la deuxième division de méiose, la chromatide présente dans le spermatocyte primaire est séquestrée au niveau d'un des pôles de la cellule. La cellule héritant du chromosome X devient une spermatide et reçoit les protéines MSP tandis que l'autre devient le corps résiduel ne possédant pas ces protéines. Ce phénomène entraîne la production de deux spermatozoïdes matures seulement, tous deux possédant un exemplaire du chromosome X.

#### 4.4.2 Les chromosomes B

Les chromosomes B sont des extra chromosomes distincts du génome sauvage. Ils sont retrouvés chez de nombreuses espèces de plantes et d'animaux (Palestis et al., 2004). Ils sont la plupart du temps non essentiels et n'apporte pas de fitness aux individus les portant (Jones, 2008). Les chromosomes B comportent de nombreuses séquences répétées, des gènes non codants et des éléments transposables (Jones, 2008). Etant donné le fait qu'ils soient non essentiels, leur persistance au sein des espèces est due à leur capacité à être transmis à la génération suivante de manière égoïste. Par exemple, chez certaines espèces, il est positionnée de manière asymétrique lors de la méiose et est ainsi ségréguée dans la future cellule qui donnera le gamète (González-Sánchez et al., 2003).

Chez *Nasonia vitripennis*, qui possède un déterminisme du sexe de type haplo-diploïde, le chromosome B est nommé Paternal Sex Ratio (PSR) (Beukeboom and Werren, 2000). Le PSR est transmis à la descendance par le spermatozoïde. En présence du PSR, le génome paternel devient extrêmement condensé et les chromosomes paternels ne sont pas formés puis intégrés à la première division mitotique du zygote (Swim et al., 2012). Cependant, le PSR n'est pas affecté par ce processus et peut quant à lui subir la première division de mitose avec l'ADN maternel. En supprimant l'apport du génome paternel dans la descendance, le PSR entraîne donc le développement d'embryons fécondés en cellules haploïdes, qui donneront donc naissance à des mâles. Ces mâles portent eux-mêmes le PSR et seront donc capables de le transmettre à nouveau à leur descendance. Avant la mitose, on peut observer l'accumulation de phosphorylation de la sérine 10 de

l'histone H3 (PH3S10) sur les chromosomes, ce qui permet le recrutement de condensine sur la chromatine et la condensation des chromosomes mitotiques. Dans les embryons qui ne portent pas le PSR, cette marque est observée en quantité égale sur les chromosomes paternels et maternels. Dans les embryons portant le PSR, les chromosomes paternels accumulent cette marque de manière plus importante que les chromosomes maternels, ce qui semble empêcher leur condensation correcte, en prévision de la mitose. Le zygote étant alors haploïde, il se développera en mâle. Le PSR constitue un élément génétique égoïste, l'absence de transmission du génome paternel lui permettant d'assurer sa propre transmission à la génération suivante.

#### **4.5 Le parasite Wolbachia**

Wolbachia est une bactérie intracellulaire qui infecte de nombreux arthropodes ainsi que les nématodes filaires (Werren et al., 2008). Il est souvent transmis de la mère à sa descendance via les ovocytes (Werren et al., 1995). Wolbachia est capable de modifier le sex ratio vers une majorité de femelles d'une espèce de différentes manières. L'infection par Wolbachia peut induire la mort des mâles durant le développement embryonnaire, la féminisation d'individus génétiquement mâles, l'induction de parthénogénèse thélytoque entraînant la production de descendants femelles, ou la mort des embryons produits lors de la reproduction entre une femelle non infectée et un mâle infecté. Cette modification du pourcentage de femelles permet une augmentation de la transmission de Wolbachia au sein de la future descendance (Werren et al., 2008).

Les mécanismes cellulaires responsables de l'incompatibilité cytoplasmique sont peu connus. Lorsqu'un mâle, infecté par Wolbachia, s'accouple avec une femelle non infectée il semblerait que la première mitose du zygote soit affectée par l'asynchronie de la condensation des chromosomes maternels et paternels. Alors que les chromosomes maternels sont condensés et se placent sur la plaque métaphasique, les chromosomes paternels restent décondensés et la première division de mitose se produit sans le contenu en ADN paternel entraînant l'haploïdie du zygote (Lassy and Karr, 1996; Tram and Sullivan, 2002).



L'induction de la parthénogénèse thélytoque par *Wolbachia* n'a été reportée que chez des espèces avec un développement arrhénotoque (chez qui les mâles sont produits à partir d'embryons non fécondés). Les embryons non fécondés produiront ainsi des femelles au lieu de produire des mâles, qui pourront alors transmettre la bactérie par la production d'ovocytes. Chez certaines espèces on peut observer une anaphase abortive durant la première division de mitose du zygote résultant en une cellule diploïde au lieu de deux cellules haploïdes (Weeks and Breeuwer, 2001). Chez l'espèce *Bryobia praetiosa*, c'est le processus de méiose qui est altéré. Les femelles infectées produiront des ovocytes diploïdes par apomixie (Gottlieb et al., 2002).

La féminisation a été observée chez plusieurs espèces de cloportes. Dans ce cas, *Wolbachia* prolifère dans les glandes androgènes, inhibant ainsi leur fonction. Les mâles génétiques se développent donc en femelles (Vandekerckhove et al., 2003)

## 5. Le système de reproduction pseudogame

Comme vu ci-dessus, la pseudogamie ou « sperm dependant parthenogenesis », concerne des espèces femelles qui se croisent avec les mâles d'une autre espèce afin de féconder leurs ovocytes. En 1949, Victor Nigon a décrit l'espèce *Mesorhabditis belari* qui présente l'étonnante particularité d'être une espèce pseudogame produisant ses propres mâles (Figure 17). Les travaux de V. Nigon sont méconnus car seulement publiés en français, ainsi, ils ne sont pas cités dans les travaux effectués sur les modes de reproduction asexuée.

Comme expliqué précédemment, l'espèce pseudogame *Carrassius Gibelio* produit des femelles par gynogénèse en se croisant avec des mâles d'une autre espèce, mais produisent des mâles et des femelles lorsque les croisements sont conspécifiques. Chez *M. belari*, tous les nouveaux individus sont produits à partir des croisements entre mâles et femelles de la même espèce. Les femelles produisent systématiquement des mâles avec lesquels elles se croisent pour générer deux types d'embryons différents.

Le développement des deux types d'embryons s'apparente à celui observé dans des espèces gonochoriques d'une part ou gynogénétiques strictes d'autre part. La

comparaison de ces deux types d'embryons devrait donc permettre de comprendre quelles innovations ont eu lieu pour permettre l'émergence de ce mode de reproduction.

L'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires chez cette espèce est rendue possible par le fait que cette espèce présente plusieurs avantages pour l'étude en laboratoire. Les animaux sont petits, peuvent être congelés (comme les autres nématodes) sur de longues périodes, et peuvent facilement être entretenus. De plus, les nématodes ont l'avantage d'avoir des embryons transparents, ce qui permet d'observer les divisions cellulaires aisément. Les nématodes étant étudiés depuis longtemps, il est aussi plus facile d'avoir accès à des techniques développées pour l'étude de ces animaux.

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi d'étudier les innovations cellulaires et moléculaires qui ont permis l'émergence de ce type de pseudogamie au sein du genre *Mesorhabditis*. Nos recherches se sont basées sur l'étude menée par Victor Nigon en 1949 sur cette espèce, lui-même inspiré par Belar dans les années 1920. A notre connaissance, son étude est la dernière à avoir été menée concernant ce mode de reproduction.

*M. belari* JU2817

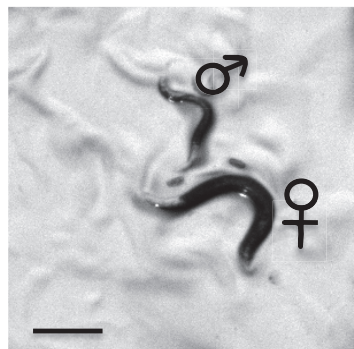


Figure 17: Photographie d'un mâle et d'une femelle de l'espèce *Mesorhabditis belari* étudiée au cours de ma thèse.

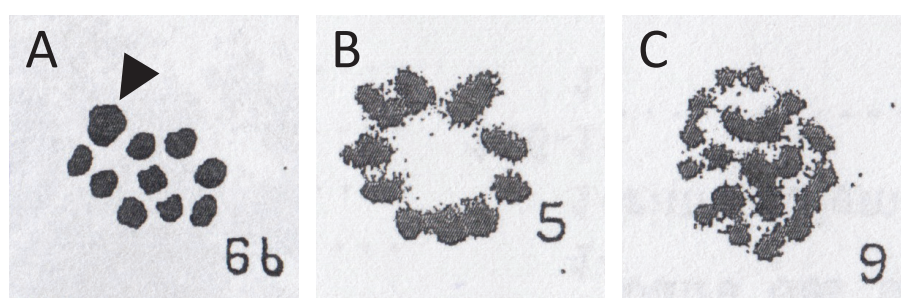
Les mâles ont une taille réduite par rapport aux femelles. La barre d'échelle représente 200µm

### 5.1 Le travail de Victor Nigon sur l'espèce *Mesorhabditis belari* et son mode de reproduction.

La souche de nématodes étudiée par Nigon avait originellement été étudiée par Belar dans les années 1920, cette souche avait été classée dans l'espèce *Rhabditis monytera* en se basant seulement sur l'étude morphologique des femelles (Belar, 1923). Après l'étude morphologique de la queue des mâles, Nigon a montré que la souche étudiée par Belar n'appartenait pas à l'espèce *R. monytera*. Il a donc par la suite appelé cette espèce *Rhabditis belari*. Les femelles de cette espèce présentent notamment une vulve postérieure et peuvent accueillir dans leur utérus au maximum trois embryons fécondés qui seront pondus avant le stade 2 cellules. Selon la phylogénie actuelle et les descriptions morphologiques, ce type d'espèce est maintenant classé dans le genre *Mesorhabditis* (Félix and Sternberg, 1996).

Belar avait montré que cette espèce présentait peu de mâles dans la population (environ 6%) et que l'entrée du spermatozoïde était nécessaire au développement embryonnaire. De plus, il a pu distinguer deux types d'embryons : un type amphimixique où la méiose femelle produit un pronoyau diploïde et où l'ADN paternel ne se décondense pas, comme chez les espèces gynogénétiques; et un autre type où le pronoyau femelle est haploïde et où l'ADN mâle se décondense. Il vit les deux pronoyaux fusionner dans ces embryons comme chez les espèces gonochoriques. Belar fit l'hypothèse que les embryons gynogénétiques donnaient des femelles et que les embryons amphimixiques donnaient des mâles.

Les travaux de Nigon se sont basés sur ces observations, et nous nous sommes basés par la suite sur ses travaux pour débiter les nôtres.



**Figure 18 : Observation des figures de méiose effectuées par Victor Nigon. Un marquage de Feulgen a été effectué sur (A) des chromosomes en prométaphase dans les gonades de mâles (B, C) des ovocytes après la fécondation. Le « sex body » décrit par Nigon est indiqué par la tête de flèche noire. Figure adaptée de (Nigon, 1949)**

## 5.2 La gamétogénèse chez *M. belari*

Tous les travaux décrits ci-dessous proviennent de la publication de 1949 de Victor Nigon (Nigon, 1949). Nigon a tout d'abord examiné la spermatogénèse et l'ovogénèse chez *R. belari*. Grâce à des marquages des chromosomes à la coloration de Feulgen, il a pu observer que les mâles comme les femelles possédaient 10 bivalents au début de la méiose, correspondant à 10 paires de chromosomes homologues. Avant l'entrée du spermatozoïde, les ovocytes sont bloqués en prométaphase de méiose 1, comme chez *C. elegans*. Lors de la spermatogénèse, il a observé qu'un des bivalents étaient plus gros que les autres. Il en a déduit que ce bivalent pourrait être composé des chromosomes sexuels, un chromosome X et un chromosome Y (Figure 18A).

Durant l'ovogénèse, il a par ailleurs pu observer différents déroulements de la méiose femelle qui étaient corrélés avec une différence dans le devenir de l'ADN paternel (Figures 18B et 18C). Grâce à ces observations sur embryons fixés, Nigon a retracé les différentes étapes de la méiose et en a déduit que dans les embryons amphimixiques la méiose se déroule comme une méiose normale, avec une division réductionnelle qui sépare les 10 paires de chromosomes homologues, et une division équationnelle qui sépare les 10 paires de chromatides sœurs (Figure 18B). Ces divisions sont chacune suivie de l'expulsion d'un globule polaire contenant le set de chromosomes ségrégués par la méiose. Dans les embryons amphimixiques, le pronoyau femelle contient donc 10 chromosomes à une chromatide, il est haploïde, et la diploïdie est restaurée avec la fusion des pronoyaux paternels et maternels. Ces embryons présentent aussi 2 globules polaires correspondant aux chromosomes homologues et aux chromatides sœurs ségrégués lors de la méiose.

Dans les embryons gynogénétiques, il a fait deux types d'observations. Ces observations ont été faites sur des embryons fixés et Nigon a interprété le déroulement de la méiose en fonction des étapes observées. Soit les 10 paires de chromosomes homologues sont ségrégués durant la division réductionnelle, puis les chromatides sœurs ne subissent pas la division équationnelle. Dans ce cas il observe 10 paires de chromosomes homologues sur la plaque métaphasique durant la métaphase de la première division de méiose et un seul globule polaire à la fin de la

méiose. Ici, le pronoyau resterait diploïde comme pour une méiose de type méiose 1 unique car les chromatides sœurs se sépareraient mais ne seraient pas ségréguées les unes des autres dans un globule polaire (Figure 18B). Soit il observe 20 chromosomes homologues sur la plaque métaphasique qu'il attribue aux 20 chromosomes qui ne sont pas appariés les uns aux autres (Figure 18C). Il en déduit que durant cette méiose, seule la division équationnelle aura lieu, entraînant la ségrégation des chromatides sœurs et donnant un pronoyau diploïde contenant tous les chromosomes présents chez la femelle mais ne présentant qu'une seule chromatide. Chez ces embryons, il n'observe aussi qu'un seul globule polaire.

Nigon déduit de ces observations que des défauts de ségrégation apparaissent lors de la méiose femelle chez les embryons gynogénétiques. Ces défauts ne semblent pas tous apparaître au même moment de la division, soit la division réductionnelle (méiose 2 unique), soit la division équationnelle est impactée (méiose 1 unique).

L'observation des figures chromosomiques avant la fécondation n'a pas permis à Nigon de distinguer entre ces deux types de méiose, en effet, tous les ovocytes présentent un appariement des 10 paires de chromosomes homologues. Il conclut de ce résultat que tous les ovocytes présentent un appariement normal des bivalents avant la fécondation, puis que les défauts d'appariement apparaissent après la fécondation.

### **5.3 Le déterminisme du sexe chez *M. belari***

Nigon s'est ensuite penché sur le déterminisme du sexe chez ces individus. Il soupçonnait à l'avance une hétérogamétie mâle, soit des femelles XX et des mâles XY, étant donné l'observation d'un bivalent de plus grande taille lors de la spermatogénèse. Pour ce faire, il a collecté 99 embryons dont il a suivi le développement. Sur ces 99 embryons, 80 étaient gynogénétiques (un seul pronoyau décondensé) et 19 amphimixiques (deux pronoyaux décondensés). Il a par la suite séparé les deux types d'embryons et a examiné les animaux qui en provenaient. Il a observé 25 embryons gynogénétiques qui ont tous donné des femelles. Parmi les

œufs amphimixiques, il en a observé 10 qui ont donné 3 femelles et 7 mâles. Nigon a conclu de ces résultats que les embryons amphimixiques étaient les seuls à produire des mâles, mais qu'au contraire de ce que pensait Belar, ils pouvaient aussi donner des femelles (Figure 19). Il vit aussi ici une preuve supplémentaire de l'existence de l'hétérogamétie des mâles. En effet, si les mâles portent un chromosome X et un chromosome Y, les spermatozoïdes ont une chance sur deux de porter l'un de ces deux chromosomes, et donc une chance sur deux de donner un mâle ou une femelle lorsque leur ADN est utilisé pour former le zygote. Selon lui, les femelles produisaient 20% d'embryons amphimixiques dont la moitié donnait des mâles.

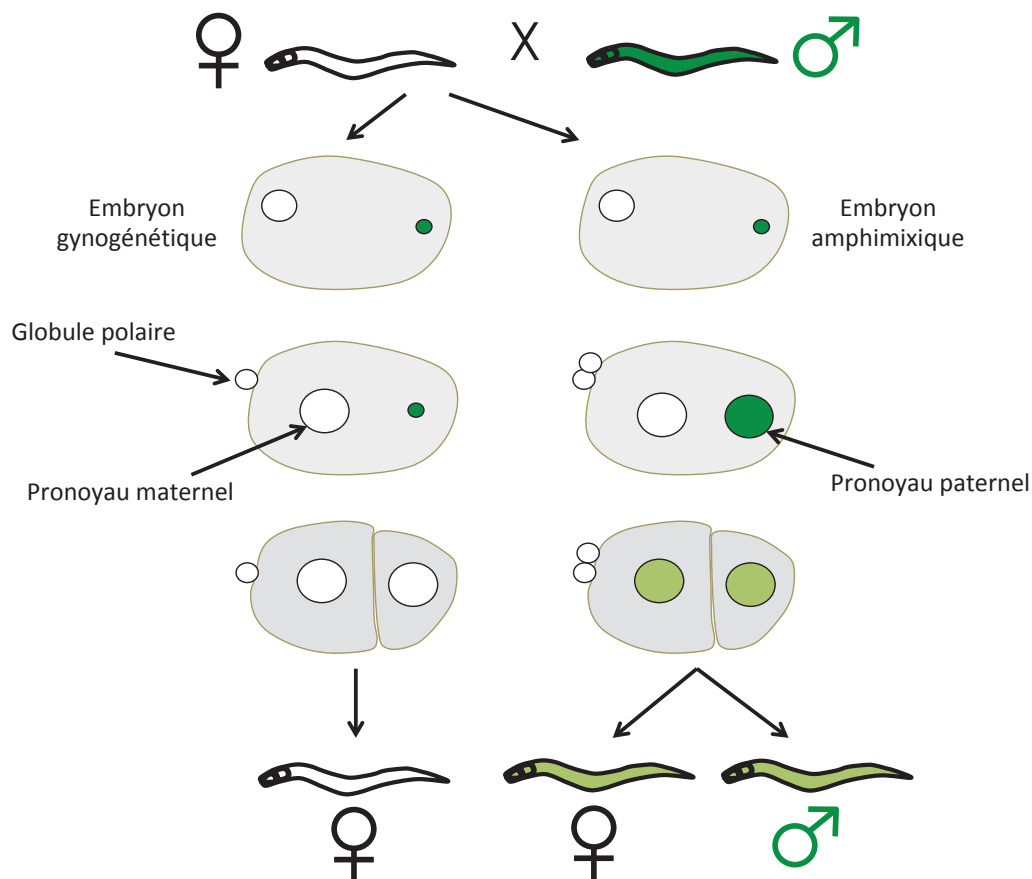


Figure 19: Le devenir des embryons selon Nigon.

L'observation du devenir des deux types d'embryons a amené Nigon à postuler que les mâles proviennent seulement d'embryons amphimixiques où l'ADN paternel se décondense et où les deux pronoyaux sont haploïdes, tandis que les femelles proviennent quant à elles d'embryons amphimixiques et gynogénétiques dans lequel l'ADN paternel ne se décondense pas et pour lequel le zygote ne se développe qu'avec l'ADN maternel. Dans ce cas, les mâles et certaines femelles partagent l'ADN paternel et maternel alors que le reste des femelles provenant d'embryons gynogénétiques n'héritent que du génome de leur mère. Les globules polaires contiennent les lots de chromosomes ségrégués hors du futur embryons lors de la méiose.

#### 5.4 La proportion des sexes chez *M. belari*

Nigon a vérifié le pourcentage de mâles observé dans cette espèce par Belar. Pour cela, il a pratiqué onze cultures à 15°C. La culture des nématodes était effectuée sur lame porte-objet, un milieu composé de [100 mL d'eau distillée, 75 mg de sulfate de magnésium, 7,5 mg de phosphate bipotassique, 275 mg de chlorure de sodium, 300 mg de nitrate de potassium, 250 mg de Peptone Witte, 100 mg de Lécithine et 1,5g de gélose était déposé en goutte sur ces lames, puis de la levure de boulanger était ajoutée comme source de nourriture. Il a placé plusieurs couples sur ces lames et a ensuite transféré les adultes sur de nouvelles lames tous les 2 jours. Il a par la suite compté le nombre de mâles et de femelles produits dans la descendance de chaque culture afin de calculer le pourcentage de mâles produits. Les différentes séries d'élevage comprenant chacune un nombre variable de couples ont montré les résultats suivants (Tableau 1).

Couples	Nombre de femelles	Nombre de mâles	Pourcentage de mâles
1	176	37	17,4
2	376	51	11,9
3	678	106	13,5
4	1056	152	12,6
5	111	12	9,8
6	177	29	14,1
7	228	48	17,4
8	194	36	15,7
9	337	10	2,9
10	1465	77	5
11	761	73	9,9

**Tableau 1: Pourcentage de mâle mesuré par Victor Nigon à 15°C. 11 séries de croisements ont été réalisées avec un nombre différent de couples par série.**

Au total, les onze séries de croisements ont permis à Victor Nigon d'établir qu'à 15°C, les femelles produisaient 10,9% de mâles. De plus, les résultats exacts ne sont pas reportés, mais il a pu constater que les femelles avaient tendance à produire plus de mâles au début de leur cycle reproductif. Afin de quantifier cela, il a donc compté le nombre de mâles et de femelles produits tous les deux jours après le début du cycle reproductif des femelles, et ce, à 13°C, 17°C, 22°C et 25°C. Les différentes séries ont montré les résultats suivants (Tableau 2).

Température 13°C			
Jours de ponte	Nombre de femelles	Nombre de mâles	Pourcentage de mâles
1er et 2eme	401	88	18
3eme et 4eme	1055	249	19,1
5eme et 6eme	897	97	9,9
7eme et 8eme	547	37	6,3
9eme et 10eme	490	32	6,1
Température 17°C			
1er et 2eme	360	55	13,3
3eme et 4eme	228	34	13
5eme et 6eme	239	31	11,5
7eme et 8eme	227	11	4,6
9eme et 10eme	73	4	5,2
11eme au 20eme	324	12	3,6
Température 22°C			
1er et 2eme	1229	175	12,5
3eme et 4eme	540	37	6,5
5eme et 6eme	165	8	4,6
7eme et 12eme	203	6	2,9
Température 25°C			
1er et 2eme	1548	232	13
3eme et 4eme	367	14	3,7
5eme et 6eme	132	8	5,7
7eme et 8eme	37	1	3

**Tableau 2: Pourcentage de mâles mesuré par Victor Nigon à différentes températures. Pour chaque température, plusieurs couples ont été croisés et leur descendance a été comptée tous les deux jours.**

De ces résultats, il a conclu que la proportion de mâles diminue à mesure que les couples vieillissent et que la disparition des mâles se fait plus rapidement à température élevée. De plus, nous pouvons remarquer qu'en fonction de la température, le nombre de jours pendant lequel les femelles pondent n'est pas le même. En effet, à 17°C les femelles semblent pondre jusqu'à 20 jours après le premier jour de ponte alors qu'à 25°C elles ne pondent que pendant 8 jours après le premier jour de ponte.

Nigon émis alors l'hypothèse que la température joue un rôle sur le nombre d'embryons amphimixiques qu'une femelle peut produire, afin de vérifier cela, il a effectué deux séries d'expériences. Dans une première expérience, il a placé des animaux à 22°C et à 25°C jusqu'à leur maturité sexuelle puis les a ensuite fait se reproduire à 14°C. Dans ces conditions, les femelles ont tendance à produire plus de mâles qu'en étant élevées puis en se reproduisant aux mêmes températures de 22°C



et 25°C, mais elle ne produisent pas autant de mâles qu'en étant élevé et en pondant à 13°C. Dans une deuxième expérience, il a placé des couples à 22°C jusqu'à leur deuxième jour de ponte et a ensuite transféré les animaux à 13°C pour la fin de leur cycle reproductif. Dans ces conditions, les femelles produisent autant de mâles que dans les conditions où elles sont maintenues pendant tout leur cycle reproductif à la même température de 22°C.

Selon Nigon, ces résultats indiquent que la température a bien un effet dans la proportion de mâles produits dans la descendance. Il en déduit aussi que l'effet de la température joue un rôle avant le début de la ponte et que son action est irréversible une fois la ponte commencée.

### **5.5 Influence de facteurs chimiques sur la proportion des sexes**

L'effet de la température sur la proportion de mâles, couplé au fait que les femelles produisent de moins en moins de mâles en vieillissant a amené V. Nigon à faire l'hypothèse que le devenir de l'embryon est dicté par le contenu de l'ovocyte avant la fécondation. Ainsi, il propose que la présence de substances dans le cytoplasme de l'œuf pourrait être de nature à modifier son fonctionnement. Il considère alors que ces substances peuvent s'accumuler au cours de la vie de l'animal, et qu'elles seront donc plus abondantes lorsque les femelles seront âgées, mais aussi qu'une température élevée pourrait avoir un impact sur la synthèse de ces substances. Ceci expliquerait selon lui pourquoi l'action d'une température élevée sur la production de mâles est irréversible.

Afin de tester cette hypothèse, il a souhaité mesurer le pourcentage de mâles produit par des femelles mises en présence d'un milieu de culture « usé » c'est-à-dire un extrait de milieu sur lequel d'autres animaux avaient déjà été cultivés. Pour ce faire, il a cultivé des animaux pendant un mois sur boîte de Petri, au bout d'un mois, le milieu de culture est devenu liquide et il en a éliminé les impuretés et les animaux par centrifugation. Il a par la suite mélangé une moitié de ce milieu « usé » liquide à une moitié de milieu habituel puis réalisé des cultures de nématodes selon les mêmes conditions qu'habituellement. Alors que les couples témoins (élevés sur

milieu habituel) ont donné 14,8% de mâles, ceux élevés sur milieu « usé » en ont donné seulement 7,8%. Ces résultats n'ont pas été reproduits lorsque le milieu « usé » utilisé était celui sur lequel d'autres espèces comme *C. elegans* avait été élevées. Il a en effet obtenu le même pourcentage de mâles avec un milieu « usé » par une autre espèce qu'avec un milieu habituel.

Il déduit de ces résultats que certaines substances, ajoutées au milieu d'élevage, provoquent une diminution de la proportion de mâles comparable à celle obtenue lors du vieillissement des femelles ou lors de croisements effectués à température élevée. Il propose donc que ces substances soient celles accumulées dans les ovocytes lors du vieillissement des femelles et accumulées plus rapidement lors de l'élévation de la température.

Les résultats apportés par V. Nigon montrent que, la proportion de mâles, et donc la proportion d'embryons amphimixiques pourraient être modulées par des conditions environnementales tels que la température ou des substances présentes dans le milieu de culture. Il semblerait donc que chez cette espèce, il existe une régulation du déroulement de l'embryogénèse précoce en fonction des facteurs environnementaux. De plus, trois propositions peuvent être faites concernant le développement des embryons i) le devenir de l'ADN paternel conditionne le devenir amphimixique ou gynogénétique de l'embryon, dans ce cas, s'il est destiné à se décondenser la méiose sera complète, ii) si la méiose est complète l'ADN paternel se décondensera et sinon, il restera condensé, iii) Un facteur inconnu contrôle à la fois la progression de la méiose femelle et le devenir de l'ADN paternel. Dans ce cas, il n'y aurait pas de lien de causalité entre ces deux évènements.

La souche étudiée par V. Nigon n'a pas été conservée, cependant de nombreuses nouvelles souches de *Mesorhabditis* ont été isolées par Marie-Anne Félix ces dernières années. Notre équipe a donc décidé de reprendre les travaux initiés par V. Nigon sur *M. belari*, dans le but de comprendre i) comment une femelle peut produire ces deux catégories d'embryons, ii) quel est le contrôle de la progression de méiose, iii) comment est contrôlé l'ADN paternel. J'ai débuté ma

thèse lorsque le projet a été initié, et j'ai ainsi exploré de nombreuses questions en relation avec ce mode de reproduction remarquable.

# Objectifs de thèse

---

Plusieurs souches pseudogames de nématodes ont été étudiées au cours du 20ème siècle, mais ces souches n'ont pas été conservées depuis. Seule une souche (*Bursilla*. sp PS1179) provenant d'Altadena aux Etats-Unis d'Amérique était conservée dans certains laboratoires. Au début de ma thèse, une souche pseudogame du genre *Mesorhabditis* (souche JU2817) a été isolée en France. Cette souche présentait l'avantage d'avoir été isolée dans une zone géographique proche de nous et de n'avoir pas été conservée pendant plusieurs années dans les laboratoires, dans des conditions inconnues de notre part. Nous avons donc décidé de nous concentrer sur l'étude de la souche JU2817 afin de comprendre comment les femelles pouvaient produire deux types d'embryons.

Selon les descriptions de V. Nigon, nous avons établi une hypothèse concernant la dynamique du développement du zygote précoce chez cette espèce. En effet, les modifications environnementales subies par les femelles semblent entraîner une modulation du pourcentage de mâles, et donc une modulation du pourcentage des deux types d'embryons. Ainsi, il semblerait que le devenir des embryons soit dicté par l'état de lovocyte avant la fécondation.

Notre objectif était donc de mettre en place des outils de biologie cellulaire ainsi que des outils génétiques afin de comprendre les mécanismes régissant :

- Le contrôle du devenir de l'embryon
- Le contrôle de la méiose femelle
- Le contrôle de l'ADN paternel
- La base moléculaire de la corrélation entre le contenu (haploïde ou diploïde) en ADN maternel à la fin de la méiose et l'état (condensé ou non) de l'ADN paternel.

Cependant, les résultats que j'ai obtenus au début de ma thèse ne correspondaient pas à ceux obtenus par V. Nigon. Ainsi, au cours de nos recherches, nous avons établi de nouveaux axes d'étude concernant l'espèce *M. belari*.

L'échantillonnage de souches du genre *Mesorhabditis* a permis de découvrir plusieurs souches pseudogames. Cet échantillonnage massif, ainsi que la caractérisation morphologique des différentes souches découvertes a été réalisé par Marie-Anne Félix. Cependant nous avons tout de même choisi de travailler avec la souche JU2817 pour plusieurs raisons i) contrairement à plusieurs autres souches, la souche JU2817 a été isolée en France, en région parisienne proche du laboratoire de Marie-Anne Félix, ce qui rendait plus facile un prochain échantillonnage dans la même région, ii) Une analyse morphologique des différentes souches pseudogames échantillonnées, et leur comparaison avec les souches étudiées et décrites dans la littérature du 20ème siècle a été menée par Marie-Anne Félix. Elle a pu déterminer que la souche JU2817 appartenait à l'espèce *Mesorhabditis belari*, espèce étudiée par Victor Nigon et dont les travaux nous ont inspirés pour démarrer ce travail de recherche. iii) par chance, en plus de la souche JU2817, nous avons isolé de nombreuses souches de *M. belari*, (une des espèces pseudogames qui comporte le plus de souches dans notre collection), permettant ainsi d'utiliser des souches naturelles génétiquement différentes pour réaliser des analyses génétiques.

Par ailleurs, cet échantillonnage a permis de découvrir des souches gonochoriques du genre *Mesorhabditis*. Ces souches sont composées de 50% de mâles et 50% de femelles. Comme chez les souches pseudogames, la fécondation est nécessaire au développement embryonnaire, mais l'ADN paternel se décondense dans tous les embryons et les embryons donneront naissance à 50% de mâles et 50% de femelles. Par une approche comparative des souches pseudogames et gonochoriques du même genre, nous avons donc essayé de comprendre comment la pseudogamie a pu émerger et quelles innovations cellulaires et moléculaires ont été nécessaires.

Je détaillerai par la suite les résultats que j'ai obtenus concernant les deux projets de ma thèse. Une première partie portera sur la caractérisation du mode de reproduction pseudogame chez la souche JU2817 de *M. belari*. Une deuxième partie portera quant à elle sur l'exploration des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ce mode de reproduction.

# Matériel et méthodes

---

## 1. Souches

La plupart des souches du genre *Mesorhabditis* ont été isolées par Marie-Anne Félix (IBENS, Paris), les autres étaient déjà présentes au stock center CGC. Au total, nous avons aujourd'hui en notre possession 59 souches de *Mesorhabditis* (dont 56 échantillonnées par Marie-Anne Félix) (Tableau 3). Les croisements entre souches, leur analyse morphologique (forme de la queue des mâles) et l'analyse phylogénétique ont permis d'établir qu'il existe au total 2 espèces différentes de *Mesorhabditis* gonochoriques et plusieurs espèces pseudogames distinctes (probablement une dizaine).

Les souches ont été entretenues sur boîtes de Pétri contenant du Nematode Growth Media (NGM : NaCl 3g, Bactopeptone 2,5g, Bactoagar 20g, H<sub>2</sub>O qsp 1L, autoclavage puis ajout cholestérol 1M 1mL, CaCl<sub>2</sub> 1M 1mL, MgSO<sub>4</sub> 1M 1mL, KPO<sub>4</sub> 1M 25mL)ensemencées avec la souche OP50 d'*Escherichia coli*. Les souches ont été maintenues à 20°C ou 25° pour la souche DF5017, et filmées à 23°C.

## 2. Axénisation/synchronisation

Des populations entières sont récoltées sur 6 boites de XX de diamètre grâce à du M9 (pour 1 litre d'eau distillée : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g, NaCl 5g, autoclavage, ajout de 10% de MgSO<sub>4</sub>). Le liquide contenant les vers est placé dans des tubes qui sont alors centrifugés puis le surnageant est ôté. Un lavage au PBS est effectué pour enlever le maximum de bactéries. Le surnageant est ôté au maximum puis 6mL d'H<sub>2</sub>O, 3,9 mL d'eau de javel et 0,1 mL de NaOH 10M sont ajoutés. Les tubes sont secoués et vortexés pendant 7 minutes au minimum jusqu'à disparitions complète des adultes et des larves. Les embryons restants sont centrifugés, le surnageant est ôté et deux lavages au M9 sont effectués. Les embryons sont ensuite déposés sur deux boites NGM fraîches sans nourriture. Lorsque les vers ont tous atteint le stade L1 (2 jours post traitement) chaque boite est répartie sur 6 nouvelles boites

contenant de la nourriture. Ceci permet d'obtenir une population de vers synchrones dans le développement, du stade L1 au stade adulte.

### **3. Croisements**

Les croisements ne nécessitant pas de connaître les liens de parenté entre les individus ont été réalisés après une étape de synchronisation de la population. Les embryons résistants au traitement ont été déposés sur boîte sans nourriture pendant 2 à 3 jours puis déplacés sur des boîtes avec nourriture. 3 jours après, les individus vierges étaient sélectionnés et déplacés sur de nouvelles boîtes.

Les croisements nécessitant de connaître les liens de parenté entre les individus ont été réalisés en sélectionnant des femelles gravides sur des boîtes contenant des populations entières. Les femelles ont été sélectionnées sur des boîtes « fraîches » c'est-à-dire des boîtes sur lesquelles les vers n'avaient pas été cultivés depuis plus de deux jours. Les femelles sélectionnées ont été déposées sur de nouvelles boîtes à raison d'une femelle par boîte. Les femelles gravides ont ensuite été déplacées de boîte en boîte tous les jours afin d'avoir une descendance homogène au niveau du développement sur la même boîte. 5 jours après la ponte des embryons, les nouveaux individus ont ensuite été sélectionnés et placés sur une nouvelle boîte pour les croiser. Les mâles et les femelles possèdent des phénotypes très distinguables après le stade L4, il est donc aisé de sélectionner les individus selon leur sexe avant le début de leur cycle reproductif.

Les modalités d'évaluation de la létalité embryonnaire, du pourcentage de mâles ainsi que du pourcentage de réussite des croisements sont décrites dans la section Matériel et Méthodes de la publication.

Espèces	Souches	Lieux d'échantillonnage
<b><i>M. spiculigera</i> - 18 souches</b>	<a href="#">AF72</a>	<a href="#">Pennsylvanie - Etats-Unis d'Amérique</a>
	JU2755	Le Blanc - France
	JU2845	Saint-Martin de Londres - France
	JU2846	Paris - France
	JU2854	Pinhao - Portugal
	JU2865	Los Angeles - Etats-Unis d'Amérique
	JU2871	Vienne - Autriche
	JU2892	Barcelona - Espagne
	JU2897	Seine et Marne - France
	JU2903	Fiesole - Italie
	JU2904	Florence - Italie
	JU3002	Cologne - Allemagne
	JU3124	Palerme - Italie
	JU3153	Heidelberg - Allemagne
	JU3156	Heidelberg - Allemagne
	JU3286	Prague - République Tchèque
JU3287	Prague - République Tchèque	
JU764	Chengyang- Chine	
<b><i>M. longespiculosa</i></b>	<a href="#">DF5017</a>	<a href="#">Lake Nakuru - Kenya</a>
<b><i>M. belari</i> - 12 souches</b>	JU2817	Orsay - France
	JU2856	Angles-sur-l'Anglin - France
	JU2859	Cambridge - Royaume-Uni
	JU3129	Coventry - Royaume-Uni
	JU3151	Saint-Aigny - France
	JU3152	Saint-Aigny - France
	JU3154	Heidelberg - Allemagne
	JU3155	Heidelberg - Allemagne
	JU3157	Heidelberg - Allemagne
	JU3158	Heidelberg - Allemagne
	JU3159	Postdam - Allemagne
JU3130	Coventry - Royaume-Uni	
<b><i>M. cranganorensis</i> - 4 souches</b>	JU3172	Bom Successo - Sao Tome
	JU3208	Bangalore - Inde
	JU3209	Bangalore - Inde
	JU3210	Bangalore - Inde
<b><i>M. littoralis</i></b>	JU2847	Ouro Preto - Brésil
<b><i>M. vernalis</i></b>	JU2848	Ouro Preto - Brésil
<b><i>M. monytera</i> - 6 souches</b>	JU2855	Saint-Gilles - France
	JU2887	Oslo - Norvège
	JU2888	Sorvagen - Norvège
	JU2889	Moskenes - Norvège
	JU3150	Etang Mouton - France
	JU3162	Orlando - Etats-Unis d'Amérique
<b><i>M. franseni</i> - 2 souches</b>	JU2870	Vienne - Autriche
	JU3174	Hampi - Inde
<b><i>M. sp JU2902</i> - 2 souches</b>	JU2902	Florence - Italie
	JU3211	Bangalore - Inde
<b><i>M. paucipapillata</i> - 5 souches</b>	JU2858	Cambridge - Royaume Uni
	JU2890	Andros - Grèce
	JU3003	Le Salleron - France
	JU3149	Etang Mouton - France
	JU3285	Melnik - République Tchèque
<b><i>M. sp JU3143</i> - 3 souches</b>	JU3143	Oku - Cameroun
	JU3147	Oku - Cameroun
	JU3148	Oku - Cameroun
<b><i>M. simplex</i> - 3 souches</b>	JU2864	Los Angeles - Etats-Unis d'Amérique
	JU3229	Wellington - Nouvelle-Zélande
	JU3248	Picton - Nouvelle-Zélande
<b><i>M. microbursaris</i></b>	<a href="#">PS1179</a>	<a href="#">Altadena - Etats-Unis d'Amérique</a>

Tableau 3: Tableau récapitulatif de toutes les espèces pseudogames et gonochoriques du genre *Mesorhabditis*.

Les espèces en bleu n'ont pas été échantillonnées par Marie-Anne Félix. Les espèces *M. spiculigera* et *M. longespiculosa* sont les espèces gonochoriques.



## 4. Production de phéromones

10mL de culture d'OP50 ont été préparées en ajoutant une colonie d'OP50 isolées sur boîte à deux tubes de 5mL de LB puis laissées sur la nuit à 37°C. Le lendemain, chaque culture de 5mL a été ajoutée à un erlenmeyer contenant 1L de milieu S-Medium (1L S-Basal (5,85g NaCl, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mL cholesterol (5mg/ml dans EtOH) H<sub>2</sub>O qsp 1L, autoclavage), 10 mL 1M potassium citrate pH6, 10mL trace metals solution, 3mL 1M CaCl<sub>2</sub>, 3mL 1M MgSO<sub>4</sub>). Les cultures liquides ont été placées pendant 2 semaines à 20°C sous agitation.

Les vers ont ensuite été centrifugés, le surnageant qui contient les phéromones est filtré grâce au Stericup 250mL (Millipore Express Plus). Le filtrat est ensuite mis à bouillir jusqu'à obtenir 100 mL de solution puis centrifugé. Le surnageant est ensuite mis à bouillir jusqu'à obtenir 10mL de solution puis centrifugé. Le surnageant est ensuite mis à bouillir jusqu'à obtenir une croûte. La croûte est grattée et réduite en poudre dans un mortier.

La poudre est récupérée dans un tube auquel 10mL d'éthanol sont ajoutés sur la nuit. Le lendemain, le tube est centrifugé et l'éthanol est ôté. 3 répétitions d'extraction à l'éthanol ont été effectuées. Après la dernière incubation, l'éthanol a été ôté puis le tube a été laissé à l'air libre pendant 24h. La poudre a ensuite été resuspendue dans 10mL d'H<sub>2</sub>O et congelé à -20°C.

Les phéromones ont par la suite été utilisées à 0,1% (1µl pour 1mL d'H<sub>2</sub>O) et 100µl de la dilution ont été déposés sur les boîtes NGM. Les boîtes ont été laissées à 4°C sur la nuit puisensemencées avec des bactéries OP50.

## 5. Marquage par immunofluorescence

### 5.1 Fixation des embryons

Environ 30 femelles gravides sont déposées sur lames dans 10µl de [1/2 M9 + 1/2 H<sub>2</sub>O] préalablement recouverte de Poly-L-Lysine 2X. La Poly-L-Lysine permet aux échantillons d'adhérer sur la lame. Les femelles sont disséquées au niveau de l'utérus pour libérer l'embryon contenu. Les embryons sont recouverts d'une lamelle

et l'excédent de liquide est absorbé à l'aide d'un papier Whatmann afin de fragiliser leur coquille. Les lames sont ensuite déposées sur des blocs d'aluminium refroidis sur carboglace durant 10 minutes au minimum. Les lamelles sont ensuite arrachées afin de détacher la cuticule des embryons permettant aux anticorps de pénétrer les cellules. Les lames sont alors baignées pendant 5 minutes dans du méthanol 100% froid conservé à -20°C.

## **5.2 Fixation des gonades**

Environ 30 femelles gravides sont déposées sur lames dans 10µl de [1/2 M9 + 1/2 H2O] préalablement recouverte de Poly-L-Lysine 4X. Les femelles sont disséquées au niveau du pharynx pour libérer la gonade. Le mélange M9/H2O est absorbé et 11µl de Paraformaldéhyde 3% sont ajoutés, une lamelle est déposée sur les échantillons et les lames sont laissées à température ambiante pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite déposées sur des blocs d'aluminium refroidis sur carboglace durant 10 minutes au minimum. Les lamelles sont ensuite arrachées pour permettre aux anticorps de pénétrer. Les lames sont baignées pendant 5 minutes dans du méthanol 100% froid conservé à -20°C.

## **5.3 Marquage**

Toutes les lames ont ensuite été traitées de la manière suivante :

Les lames ont été rincées dans du Phosphate-Buffer Saline (PBS) 1X deux fois 5 minutes, une goutte de 50µl de Bovine Serum Albumine 2% a été déposée sur les échantillons pendant 20 minutes à température ambiante. Les lames ont été rincées au PBS-Tween 0,05% (pour les embryons) ou 0,2% pour les gonades pendant 5 minutes puis une fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X. 30µl de solution de PBS1X contenant les anticorps primaires a été déposée sur les échantillons, selon l'anticorps, l'incubation était de 1h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C dans une chambre humide. Les lames ont été rincées au PBS-Tween 0,05% (pour les embryons) ou 0,2% pour les gonades deux fois pendant 5 minutes puis une fois

pendant 5 minutes dans du PBS 1X. 50µl de solution PBS 1X contenant les anticorps secondaires a été déposée sur les échantillons et laissée pendant une heure à température ambiante dans une chambre noire et humide. Les lames ont ensuite été baignées dans 200mL de PBS 1X auxquels 30µl de Hoechst (Sigma 1mg/mL) ont été préalablement ajoutés, puis dans 200mL de PBS-Tween et finalement dans du PBS 1X. Les échantillons sont enfin recouverts d'un milieu de montage (détails) puis d'une lamelle scellée au vernis. Les lames sont conservées à 4°C.

## 6. Imagerie

### 6.1 Films en DIC

La microscopie DIC permet d'observer des échantillons avec un effet de relief permettant pour les embryons transparents de nématodes d'observer les structures cellulaires telles que les pronoyaux, les noyaux ou les centrosomes. Des femelles gravides sont disséquées dans un milieu [1/2 M9 ; ½ H2O] qui permet aux embryons de sortir de l'utérus disséqués et d'être maintenus dans un milieu physiologique.

Les embryons sont déposés sur coussin d'agarose 2% entre lame et lamelle. Ils sont ensuite visualisés avec un microscope Axiolmager Zeiss. Le microscope est équipé d'un objectif à huile x100 et d'une lentille Plan Achromat NA 1.4. Pendant le développement embryonnaire, les images sont enregistrées toutes les 0,5s par une caméra Kappa DX4-285FW au format .tiff et converties en films QuickTime via le logiciel ImageJ. Afin de définir le type d'embryons (amphimixique ou gynogénétique) le nombre de pronoyaux décondensés est compté après la fin de la méiose femelle.

Pour réaliser l'analyse de stade de développement des vers, la même technique a été utilisée sans dissection afin d'observer les vers entiers. Plusieurs images ont été prises pour un même ver, la reconstruction des vers entiers a été faite grâce au plugin MosaicJ via le logiciel ImageJ.

## 6.2 Confocal LSM 710

Les embryons et les gonades immunomarquées ont été observés grâce à un microscope spectral confocal Zeiss LSM710. Les embryons ainsi que les noyaux des gonades ont été observés grâce à un objectif à huile X63. Les gonades entières ont été observées grâce à un objectif à huile x40. Lorsque les gonades étaient trop grandes pour être enregistrées en une image, plusieurs images ont été prises et une reconstruction du tissu entier a été faite grâce au plugin MosaicJ via le logiciel ImageJ.

## 7. Lyse de vers

1µl de Protéinase K est ajouté à 100µl de Worm Lysis Buffer (WLB, pour 5 mL : 4,225µl H<sub>2</sub>O, 500µl tampon PCR 10X, MgCl<sub>2</sub> 100mM 50µl, Tween 20 10% 225µl). 10µl du mélange sont répartis par tube, 1 ver vivant est ajouté dans chaque tube. La réaction de lyse est réalisée à 65°C pendant 1h puis 95°C pendant 15 minutes. Cette lyse permet une extraction de l'ADN d'un ver unique.

## 8. PCR et qPCR

Chaque gène a été amplifié par PCR puis qPCR pour 4 mâles et 4 femelles uniques. 1 µl de lyse a été utilisé pour chaque PCR. Pour la qPCR, les lyses de chaque vers ont été diluées au 1/20 puis en cascade au 1/3 3 fois. 3µl de chaque dilution ont été utilisés pour réaliser la gamme de qPCR. Le mix de réaction était composé de 10µl de MIX TaKaRa (SYBR Green Premix Taq, Ozyme), 4µl de primers 2,5µM, 3µl de lyse et 3µl d'H<sub>2</sub>O. Chaque qPCR a été réalisée en triplicat technique. Les qPCR ont été réalisées sur une machine Biorad, avec le programme suivant : 95°C 3 minutes, [95°C 20 secondes, 64°C 30 secondes, acquisition de la fluorescence] X40, 95°C 30 secondes, [60°C à 95°C] incrémentation de 0,5°C toutes les 5 secondes.

# Résultats Partie I

---

## 1. Caractérisation de la souche pseudogame *M. belari* JU2817

Durant les premiers mois de ma thèse, sur la base de ce qui a été décrit chez *C. elegans* mais aussi chez d'autres nématodes non modèles, j'ai cherché à caractériser l'espèce *M. belari*. En effet, cette espèce a été décrite par Victor Nigon mais les conditions de culture mises en place n'étaient pas les mêmes que les nôtres et nous ne pouvons pas exclure que la souche étudiée à l'époque n'était pas la même que celle que nous avons choisie d'étudier.

### 1.1 Cycle de vie de *M. belari*

Nous avons tout d'abord déterminé le cycle de vie de cette espèce. Pour cela, nous avons isolé des embryons sur boîte et pris des photos en microscopie DIC des différents stades observables chez cette espèce, pour les mâles et les femelles (Figure 20). *C. elegans* possède un cycle de vie de 3 jours à 20°C, de l'état embryonnaire à l'état d'adulte fertile. *M. belari* possède quant à lui un cycle de vie plus long, 7 jours sont nécessaires à un individu à 20°C pour passer du stade embryonnaire au stade d'adulte fertile. Chez *M. belari* les embryons sont pondus très précocement dans leur développement, parfois juste après la fécondation mais le plus souvent au cours de la première division ou au stade 2 cellules, car contrairement à d'autres espèces de nématodes, l'utérus des femelles ne permet d'accueillir qu'un seul embryon fécondé. Les embryons sont donc pondus très tôt afin de pouvoir accueillir rapidement un autre embryon fécondé dans l'utérus. J'ai pu par ailleurs observer que *M. belari* possède un cycle de vie plus court à 25°C (environ 4 à 5 jours) et plus long à 16°C (environ 10 à 11 jours). Entre le stade embryonnaire et le stade adulte, les nématodes se développent sous forme larvaire, chez *C. elegans* 4 stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) ont été observés, tous séparés par

une période de mue et caractérisés par des modifications dans le développement de la gonade. En s'appuyant sur le développement de la gonade nous avons retrouvé le même nombre de stades larvaires chez *M. belari*. Nous les avons nommés de la même manière que chez *C. elegans*, cependant nous n'avons pas cherché à caractériser le nombre de mues.

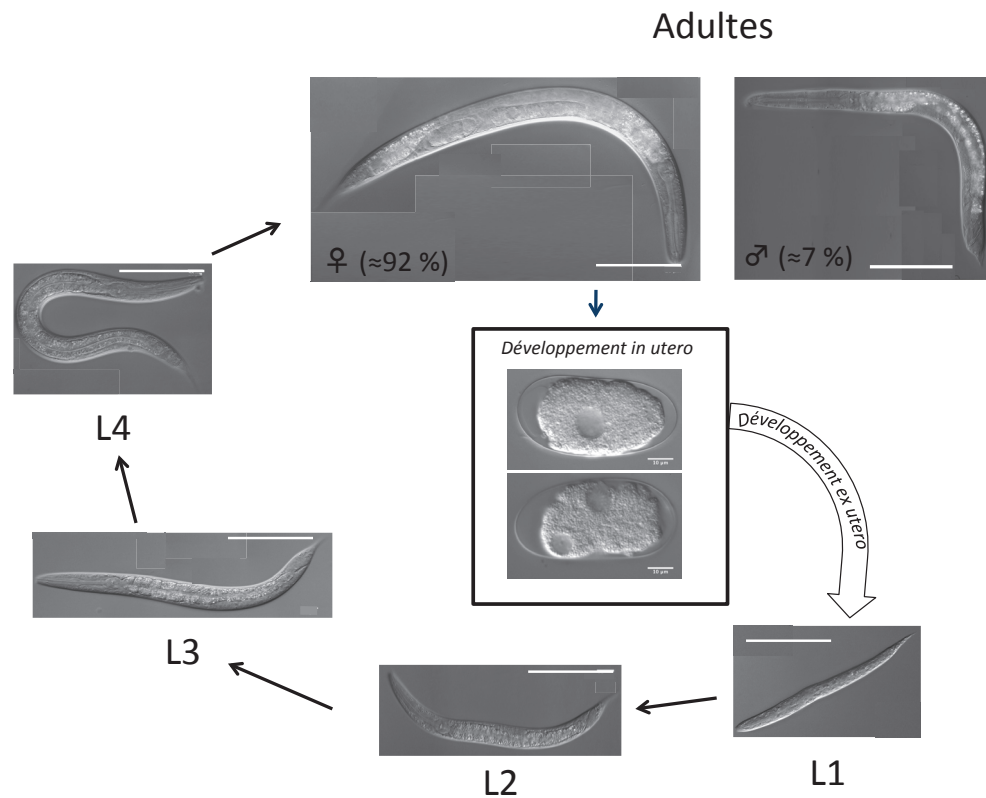


Figure 20: Cycle de vie de *M. belari* JU2817.

Le cycle de vie est d'environ 7 jours à 20°C pour un individu. Les différents stades larvaires (L1, L2 L3 et L4) ont été déterminés en fonction du développement de la gonade. Les embryons sont pondus avant le stade 4 cellules. La barre échelle représente 100µm.

## 1.2 Stade dauer chez *M. belari*

Chez *C. elegans* comme chez de nombreux nématodes, un stade de dormance nommé stade « dauer » a été observé pour les vers au stade L1 lorsque les conditions environnementales sont dégradées (Hu, 2007). Lors du retour des conditions permettant le bon développement des nématodes, ceux-ci sortiront du stade dauer directement au stade L3 et reprendront leur cycle de vie. Lors du stade dauer, chez *C. elegans*, les larves deviennent transparentes et prennent une forme droite. Les larves dauer peuvent résister pendant de nombreux mois sans nourriture.

Chez *M. belari*, des larves ayant la morphologie décrite chez *C. elegans* n'ont pas été observées. En revanche, nous avons observé que les adultes sur boîtes sans nourriture adoptaient un comportement particulier en s'enroulant sur eux-mêmes (figure 21). Nous avons donc voulu tester s'il existait tout de même un stade de résistance au stade larvaire ou adulte pour cette espèce. Pour cela, nous avons laissé des populations sur boîte après la consommation totale de leur nourriture pendant plusieurs semaines. Des morceaux de gélose contenant les vers affamés de différents stades étaient ensuite replacés sur des boîtes fraîches avec de la nourriture. Nous avons constaté qu'au delà de deux mois de jeûne, les vers ne reprenaient pas leur cycle de vie. Ce résultat suggère que chez *M. belari*, l'absence de nourriture n'entraîne pas l'entrée en dauer. Cependant, nous n'avons pas testé d'autres types de stimuli et ne pouvons donc pas conclure que cette espèce n'est pas capable d'entrer dans un stade de résistance.

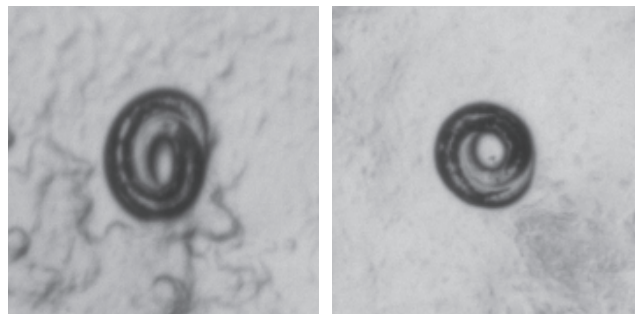


Figure 21: Photographie de deux vers enroulés autour d'eux mêmes lors de la déprivation de nourriture

### 1.3 Synchronisation de la population

Chez plusieurs espèces de nématodes, il est possible de synchroniser une population. Pour cela, la population entière, embryons, larves et adultes est mise en présence d'eau de Javel et de soude, sous agitation. La coquille des embryons protège ceux-ci du traitement, tandis que les larves et les adultes meurent. Une fois récupérés et rincés, les embryons sont déposés sur boîte gélosée sans nourriture et se développeront jusqu'au stade L1. L'absence de nourriture empêche le passage du stade L1 au stade L2. Les individus, peu importe le stade embryonnaire auquel ils ont

été déposés sur boîte seront donc bloqués au stade L1 tant qu'une source de nourriture ne sera pas ajoutée. Après l'ajout de nourriture les vers reprennent leur cycle de vie de manière synchronisée (Porta-de-la-Riva et al., 2012).

J'ai pu observer que cette méthode de synchronisation fonctionne chez *M. belari*. Par la suite, afin d'obtenir des cohortes d'individus vierges juste avant le passage au stade adulte, j'ai laissé des embryons axénisés se développer sur boîtes sans nourriture pendant trois jours. Les larves synchronisées sont ensuite déplacées sur boîtes avec nourriture. Après trois jours, les vers ont atteint le stade L4 et n'ont pas encore pondu d'embryons. Ils sont alors transférés sur de nouvelles boîtes pour réaliser des croisements entre individus vierges.

#### **1.4 Le taux de croisements produisant une descendance est faible**

Lors de ces croisements nous avons observé que leur taux de réussite était très faible comparé aux taux de réussite observé en général chez les nématodes. Lorsqu'une femelle et un mâle ont été croisés, seuls 2% des croisements (1 sur 57) ont donné une descendance, lorsque 5 femelles et 1 mâles ont été croisés, 40% des croisements (20 sur 50) ont donné une descendance. L'ajout d'un mâle supplémentaire a permis par la suite d'augmenter le taux de réussite des croisements à environ 50%.

La faible mobilité des individus, et surtout des mâles nous a amené à penser que l'absence de rencontre entre mâles et femelles était à l'origine de l'absence de production de descendance. Nous avons donc tenté de réaliser des croisements dans des plaques 12 puits (le diamètre de la boîte passant de 60mm à 12mm) mais cette condition n'a pas permis d'obtenir plus de croisements avec descendance. La possibilité de rencontrer un partenaire ne semble pas être la raison pour laquelle les individus n'acceptent pas de se reproduire. De plus, des croisements réalisés entre 10 femelles et 2 mâles n'ont pas permis d'augmenter le taux de réussite obtenu par rapport à des croisements entre 5 femelles et 2 mâles. Par la suite, nous avons donc décidé de réaliser des croisements entre 5 femelles et 2 mâles, cette condition permettant d'obtenir un ratio correct de croisements donnant une descendance.



## 1.5 Mesure du pourcentage de mâles

L'espèce *M. belari* étant caractérisée par un faible pourcentage de mâles, j'ai cherché à mesurer ce pourcentage de manière précise. Pour cela, j'ai isolé 5 femelles et 2 mâles (P0) vierges sur une boîte, et les ai laissés se reproduire jusqu'à la fin de leur cycle reproductif. Les mâles et les femelles de leur descendance ont ensuite été comptés. Les femelles JU2817 pondent pendant 8 jours après la première ponte. Sachant qu'au bout de 7 jours, les nouveaux individus sont capables de pondre à leur tour, les parents P0 ont été déplacés de boîte en boîte tous les 3 jours afin d'éviter de confondre leur descendance avec la descendance potentielle des F1. Afin de compter le pourcentage exact de mâles, les individus étaient retirés de la boîte après avoir été comptés. Pour réaliser cette mesure, j'ai effectué 38 croisements avec 5 femelles et 2 mâles, et compter 3743 F1. Parmi ces F1, 288 étaient des mâles, et le reste des femelles, cette proportion donne un pourcentage de mâles de 7,8%.

## 1.6 Tentatives de modulation du pourcentage de mâles dans la population

Victor Nigon a montré que le pourcentage de mâles dans l'espèce *M. belari* peut varier en fonction des conditions environnementales telles que la température, la quantité de nourriture ou de l'âge des mères. Ces résultats suggèrent que *M. belari* serait capable de moduler la quantité de mâles dans la population en fonction des facteurs environnementaux, et donc de s'adapter à ces changements. Nous avons cherché à reproduire ces résultats dans le but d'obtenir potentiellement plus de mâles (et donc plus d'embryons amphimixiques). Cela nous aurait permis de réaliser plus facilement certaines expériences grâce à un échantillonnage plus aisé des deux types d'embryons.

Dans un premier temps, nous avons pu remarquer, comme Nigon, que les femelles avaient tendance à produire plus de mâles au début de leur cycle reproductif. En effet, dans l'expérience précédente, nous constatons que même si le pourcentage total de mâles dans la descendance est de 7,8%, un pic de production de mâle est obtenu au deuxième jour de ponte, atteignant 20% (Figure 22A).

Cependant, cette variation du pourcentage de mâles est corrélée à une variation du nombre total d'embryons pondus, qui est aussi plus élevé au deuxième jour de ponte (Figure 22B). Ainsi, soit le pourcentage de mâles dans la population décroît avec l'âge des mères soit les femelles pondent moins de mâles en vieillissant simplement parce qu'elles ne produisent que très peu d'embryons (une femelle adulte de 7 jours pond environ seulement 4 œufs en 1 jour). A partir de l'expérience précédente réalisée sur 38 croisements, nous avons réalisé un test statistique de rangs pour tester s'il y avait un effet jour sur le pourcentage de mâles en prenant en compte la production totale d'embryons par jour. Le résultat montre que le pourcentage de mâle est bien corrélé au nombre d'embryons pondus chaque jour par les femelles et donc « par chance » plus élevé quand le nombre d'embryons est plus élevé. L'âge des mères ne semble donc pas avoir un impact sur le pourcentage de mâles dans la population.

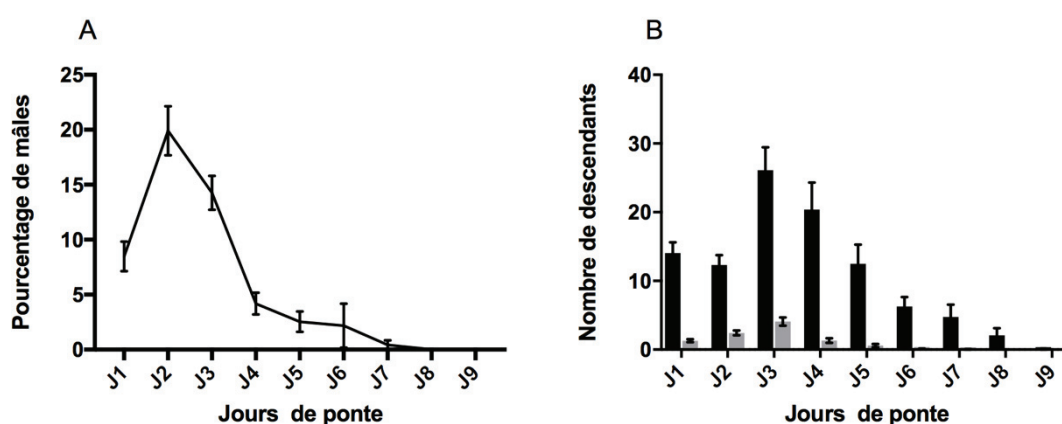
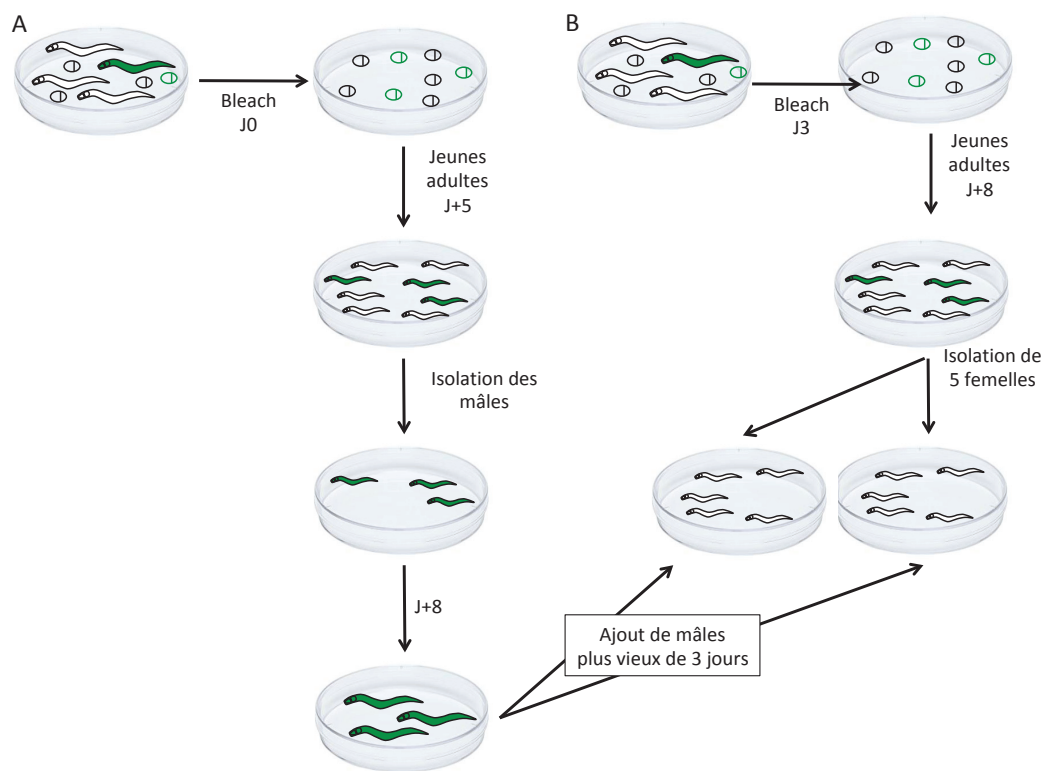


Figure 22: Le pourcentage de mâles est corrélé au nombre d'embryons pondus par les mères. Les graphes représentent les moyennes pour 38 croisements différents réalisés à 20°C. (A) pourcentage de mâles au sein de la descendance produite chaque jour. (B) Nombre de descendants totaux (noir) produits chaque jour par 5 femelles et nombre de mâles (gris) parmi ces descendants. Les barres représentent l'écart type à la moyenne calculé à partir du pourcentage de mâles ou du nombre de descendants produit par chaque croisement.

### 1.6.1 Incidence de l'âge des pères

Dans l'expérience précédente, le pourcentage de mâles a été calculé pour des parents (mâles et femelles) vieillissant ensemble. Cependant, il est possible que

l'âge d'un seul des parents soit responsable de la variation du pourcentage de mâles dans la descendance. Afin de vérifier cela, nous avons voulu découpler l'effet de l'âge des pères de celui de l'âge des mères. Nous avons donc réalisé un autre type de croisement pour savoir si l'âge des pères influence le pourcentage de mâles dans la F1. Afin de tester cette hypothèse, des mâles vierges ayant atteint le stade adulte depuis trois jours ont été isolés (mâles J3). Ils ont ensuite été croisés à des femelles vierges L4 (femelles J0) (Figure 23). Les mâles sont donc plus vieux de 3 jours que les femelles avec lesquelles ils sont croisés. Pour cette expérience j'ai réalisé 63 croisements de 5 femelles avec 2 mâles. Ces croisements ont donné 7.8% de mâles (Figure 24).



**Figure 23: Protocole de croisement entre des mâles vieux et des femelles jeunes.**

La synchronisation de deux populations est réalisée à trois jours d'intervalle. (A) Seuls les mâles sont isolés à partir de la première axénisation à partir du stade jeunes adultes et laissés sur une nouvelle boîte pour trois jours. (B) Trois jours plus tard, seules les femelles sont isolées de la deuxième axénisation au stade jeune adulte et les mâles plus vieux de trois jours sont ajoutés pour réaliser le croisement.

Ainsi, le pourcentage de mâles produit par ses croisements est égal à celui produit lors de croisements entre individus jeunes, mais les jeunes mâles produisent plus de descendants et donc plus de fils en totalité, il n'est donc pas intéressant

d'utiliser des mâles plus vieux pour réaliser nos croisements. On dénombre en effet 109 individus et 10 mâles en moyenne pour des individus jeunes contre 97 individus et 7 mâles pour des individus vieux.

Lorsque les femelles sont croisées avec des mâles plus vieux, elles produisent environ 40 embryons le premier jour de ponte, contre 15 en moyenne lorsqu'elles sont croisées avec des mâles jeunes (Figure 24B). Cependant, on peut observer que les femelles croisées avec des mâles vieux pondent moins longtemps que celles croisées avec des mâles jeunes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les mâles ont un stock de spermatozoïdes limité. Les mâles vieux pourraient transférer plus de spermatozoïdes aux femelles lors du premier jour d'accouplement, mais seraient ensuite limités par le nombre total de spermatozoïdes qu'ils sont capables de transférer. Le nombre moyen de jours pendant lesquels une femelle est donc capable de pondre se trouve réduit par rapport à des femelles croisées avec des mâles jeunes car beaucoup d'embryons sont pondus le premier jour.

De plus, alors que beaucoup d'embryons sont pondus le premier jour, on n'observe pas de pic de pourcentage de mâles comme dans l'expérience précédente. Mis à part ce point, le nombre de mâles semble corrélé au nombre total d'embryons pondus, avec une diminution graduelle du pourcentage de mâles à mesure que le nombre d'embryons pondus décroît.

Étant donné que le pourcentage total de mâles est égal à celui produit par des mâles jeunes, l'âge des pères ne semble pas avoir une incidence sur le pourcentage de mâles produit dans leur descendance. En revanche, l'âge des pères semble avoir une incidence sur le nombre total d'embryons produits et sur la dynamique de la ponte des femelles.

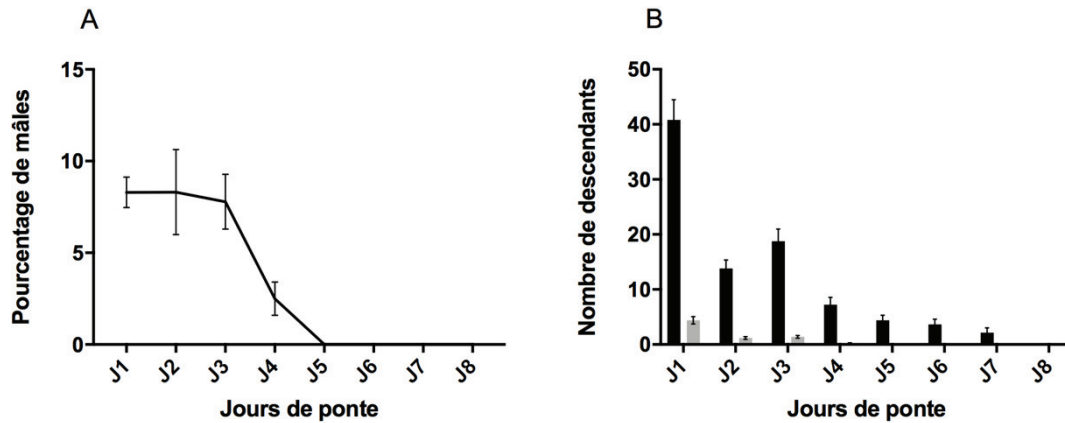


Figure 24: l'âge des pères n'a pas d'influence sur le pourcentage de mâles mais sur le nombre de mâles dans la descendance. Les graphes représentent les moyennes pour 63 croisements différents réalisés à 20°C avec des mâles ayant atteint le début de leur cycle reproductif depuis 3 jours. (A) pourcentage de mâles au sein de la descendance produite chaque jour. (B) Nombre de descendants totaux (noir) produits chaque jour par 5 femelles et nombre de mâles (gris) parmi ces descendants. Les barres représentent l'écart type à la moyenne calculé à partir du pourcentage de mâles ou du nombre de descendants produit par chaque croisement.

#### 1.6.2 Incidence de la variation des facteurs environnementaux

Victor Nigon a décrit que des variations de température entraînent une variation du pourcentage de mâles dans la population, avec certaines conditions permettant d'obtenir jusqu'à 20% de mâles dans la population. Afin de reproduire ces résultats j'ai comparé le pourcentage de mâles dans des populations ou les individus étaient élevés à 20°C, 25°C et 16°C. Pour cela j'ai maintenu des populations pendant 3 semaines à ces différentes températures et j'ai ensuite croisé 5 femelles et 2 mâles provenant de ces populations. J'ai ensuite mesuré le pourcentage de mâles dans la descendance produite par ces différents croisements jusqu'à la fin du cycle reproductif. A 25°C le pourcentage de mâles est de 8,4%, et de 6,5% à 16°C (Figure 25). Il semblerait que les pourcentages de mâles soient moins élevés à 16°C et très faiblement supérieur à 25°C qu'à 20°C sans que ces résultats soient cependant statistiquement significatifs (ANOVA, p-value= 0,09). Changer les températures de culture des nématodes ne permet donc pas d'obtenir une proportion beaucoup plus importante de mâles dans la population.

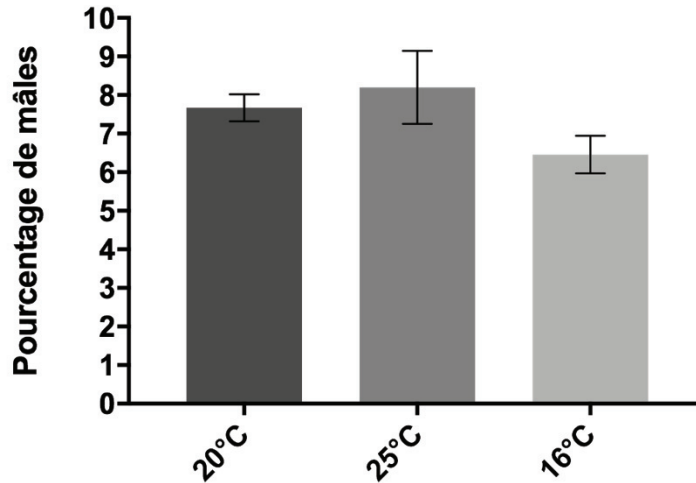


Figure 25: La température a une faible incidence sur le pourcentage de mâles dans la descendance. Les graphes représentent les moyennes pour des croisements réalisés à 20°C (n=37), 25°C (n=8) et 16°C (n=18). Les barres représentent l'écart type à la moyenne calculé à partir du pourcentage de mâles ou du nombre de descendants produit par chaque croisement. Un test One-way ANOVA a été réalisée et a montré que les différences entre chaque température sont non significatives.

J'ai ensuite comparé le pourcentage de mâles dans des populations ou les individus étaient élevés à 20°C puis croisés à 20°C, 16°C et 25°C. Le changement de température pour les individus se reproduisant à 16°C ou à 25°C a été réalisé 1 jour avant le début du cycle reproductif. Le pourcentage de mâles dans la descendance a ensuite été mesuré durant les 5 premiers jours de ponte. Les croisements à 20°C ont donné environ 7% de mâles alors que les croisements à 25°C ont donné 10% de mâles et ceux à 16°C, 11% de mâles (Figure 26). Ce changement de température ne permet pas d'obtenir des taux beaucoup plus élevés de mâles, nos conditions d'expérimentations sont toutefois très différentes de celle de Victor Nigon et sont compliquées à mettre en place, nous avons donc décidé de ne pas poursuivre ces expériences.

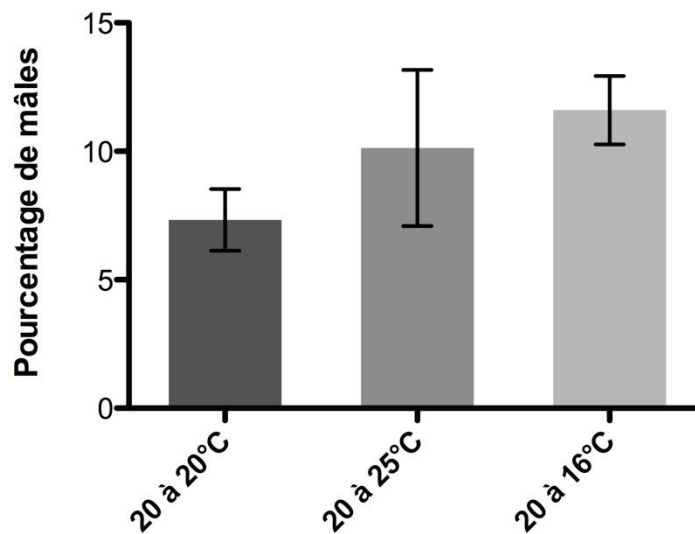


Figure 26: Les femelles produisent plus de mâles lorsqu'elles sont exposées à un changement de température au début du cycle reproductif. Les graphes représentent le pourcentage de mâles produits par des femelles cultivés à 20°C jusqu'au premier jour de leur cycle reproductif puis exposées à 20°C, 25°C et 16°C jusqu'à la fin de la ponte. Les barres représentent l'écart type à la moyenne calculé à partir du pourcentage de mâles produit par chaque croisement.

### 1.6.3 Effet de l'ajout de phéromones

L'ajout de phéromones sur les populations de *M. belari* a aussi permis à Victor Nigon de faire varier le pourcentage de mâles au sein de la descendance (environ 7% de mâles sont produits avec les phéromones contre 14% sans les phéromones). Afin de tester ces effets, j'ai donc extrait les phéromones d'une population totale de *M. belari* et effectué des croisements entre 20 femelles et 2 mâles avec ou sans ajout de phéromones. Les phéromones sont extraites en cultivant les nématodes dans du LB liquide. Après 2 semaines de culture, les vers sont filtrés et le surnageant est porté à ébullition. Le résidu du surnageant est ensuite dilué et déposé sur boîte avant de croiser les vers entre eux. Les vers ont été croisés pendant trois jours avec ou sans phéromones puis le nombre de mâles et de femelles dans leur descendance a été compté. Similairement aux résultats obtenus par Victor Nigon, l'ajout de phéromones entraîne une réduction du pourcentage de mâles dans la descendance. Les vers croisés avec ou sans phéromones ont produit approximativement le même nombre de descendants, 155 et 153 embryons en moyenne respectivement (unpaired T test p-value = 0,91) (Figure 27A). Concernant

le pourcentage de mâles dans cette descendance, les croisements sans phéromones ont produit environ 17,4% de mâles alors que les croisements avec phéromones ont produit 7,4% de mâles (unpaired T test p-value < 0,0001) (Figure 27B).

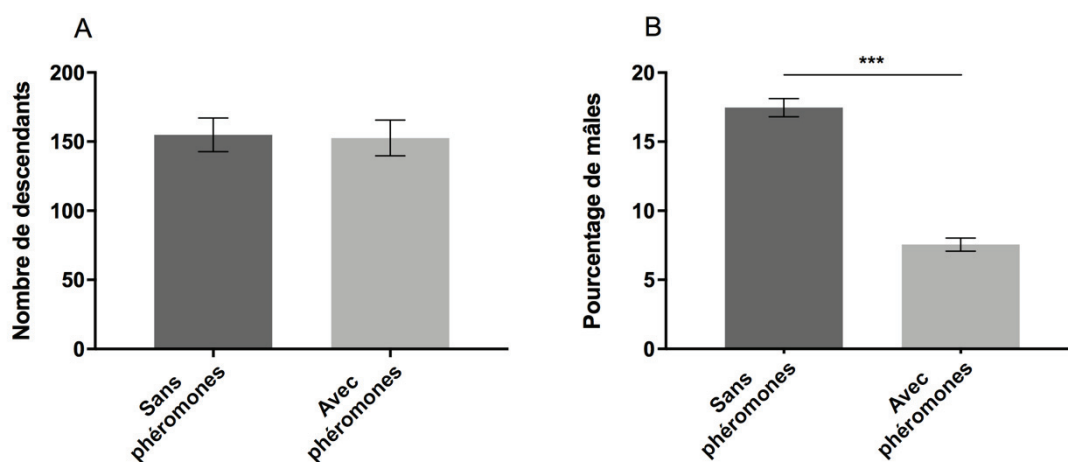


Figure 27: L'ajout de phéromones entraîne une baisse du pourcentage de mâles. Les graphes représentent les moyennes pour des croisements réalisés sans ajout de phéromones (n=20), ou avec ajout de phéromones (n=45). (A) nombre de descendants moyens produits pour chaque type de croisement (unpaired T test, p-value = 0,91) (B) pourcentage de mâles moyen produit dans la descendance pour chaque type de croisement (unpaired T test, p-value < 0,0001). Les barres représentent l'écart type à la moyenne calculé à partir du pourcentage de mâles ou du nombre de descendants produit par chaque croisement.

L'ensemble des tests effectués n'a pas permis de réaliser des croisements produisant plus de mâles dans la descendance. De plus, seul l'effet des phéromones permet de reproduire les résultats obtenus par Victor Nigon. L'hypothèse selon laquelle les femelles seraient capables d'influencer le pourcentage d'embryons amphimixiques produit ne semble donc pas vérifiée à part lorsqu'elles sont mises en présence des phéromones. En effet, les différentes expériences présentées ci-dessus ont montré que ni l'âge des mères ni la température ont un impact important sur le pourcentage de mâles dans la population.

## 1.7 Mutagénèse Aléatoire

Au tout début de ma thèse nous avons fait le raisonnement que si nous obtenions des mutants affectant le pourcentage des mâles, nous pourrions entreprendre une approche génétique pour comprendre les mécanismes cellulaires



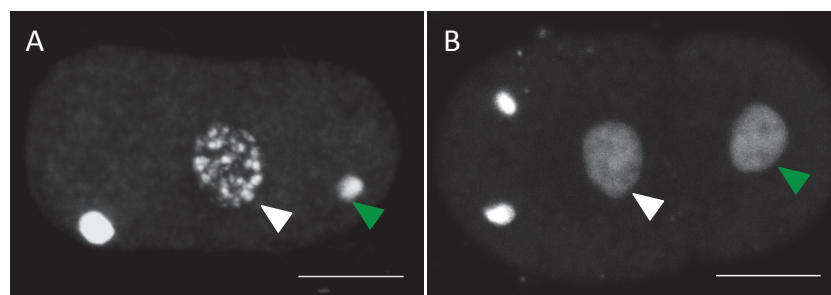
du contrôle du sex ratio dans cette espèce. En effet, même dans des espèces où peu d'outils sont disponibles, les approches NGS permettent de mapper facilement des gènes d'intérêt. Même si, d'après Nigon un très faible têt de femelles amphimixiques sont produites, il aurait alors été possible d'identifier des mutants homozygotes récessifs. Avant d'entreprendre un tel projet, nous avons d'abord réalisé une mutagénèse et un crible à petite échelle pour identifier des mutants phénotypiques de *M. belari*. Chez les nématodes, les mutants phénotypiques sont identifiables grâce à une paralysie (mutants de type *unc*), des mouvements de roulement sur eux-mêmes (mutants de type *rol*) ou encore une taille réduite (mutants de type *dumpy*) Ces mutants sont utilisés chez les nématodes pour réaliser des croisements avec des marqueurs génétiques, et permettent d'établir une carte génétique grâce à la localisation de ces marqueurs sur les chromosomes. Pour ce faire, nous avons réalisé une mutagénèse à l'EMS (Ethyl Methyl Sulfonate) avec un protocole préétabli chez les nématodes (Kutscher, 2014). L'analyse de la F1 permettant de trouver des mutations dominantes ne nous a pas amenée à trouver des individus phénotypiquement différents des individus sauvages. L'analyse de la F2 puis de la F3 permettant d'identifier des mutations récessives ne nous a pas non plus amenée à trouver de tels mutants. Ce type de mutagénèse aléatoire permet aisément de trouver des mutants au phénotype identifiable chez d'autres espèces de nématodes. L'absence de tels mutants chez *M. belari* était prévisible étant donné que, contrairement à ce qui a été décrit par Victor Nigon, les embryons amphimixiques ne produisent que des mâles. L'obtention de mutations hétérozygotes ponctuelles est alors possible, mais il sera impossible par la suite de croiser des mutants mâles et femelles entre eux pour obtenir des femelles homozygotes. Cette découverte nous a poussée à ne pas poursuivre plus avant nos investigations concernant des mutants présentant un pourcentage différent de mâles.

### **1.8 Les embryons amphimixiques ne donnent que des mâles et les embryons gynogénétiques que des femelles**

Les résultats de Victor Nigon indiquent que les embryons gynogénétiques ne produisent que des femelles alors que les embryons amphimixiques produisent 50%

de mâles et 50% de femelles, mais aussi que le pourcentage de mâles est d'environ 10% dans la population. Ceci signifie que le pourcentage d'embryons amphimixiques produit par les femelles serait d'environ 20%. Pour cela il a observé les embryons au microscope et les a triés sur la base du nombre de pronoyaux décondensés qu'ils possédaient. Un pronoyau décondensé correspond au pronoyau femelle diploïde et donc à un embryon gynogénétique. Deux pronoyaux correspondent aux ADN maternels et paternels décondensés et donc à un embryon amphimixique. Il a par la suite isolé ces embryons et observé le sexe des individus provenant de ces différents types embryons. Ces résultats montrent que parmi 25 embryons gynogénétiques, tous ont donné des femelles et que parmi 10 embryons amphimixiques 3 ont donné des femelles et 7 des mâles.

Lors de nos observations du développement des embryons au microscope DIC nous avons pu constater que les femelles produisaient un très faible nombre d'embryons amphimixiques, proche du nombre de mâles produit par ces mêmes femelles. De plus nous avons réalisé des marquages d'embryons au Hoechst provenant de femelles jeunes disséquées (n=258). Les femelles jeunes ont tendance à produire entre 10 et 20% de mâles et nous avons observé 12% d'embryons possédant deux pronoyaux (n=31) contre 88% possédant un seul pronoyau décondensé (n=227) (Figure 28). Ceci suggérerait que le taux d'embryons amphimixiques ne correspond pas forcément au double du taux de mâles observé, mais lui serait plutôt identique.



**Figure 28: Un seul ou deux pronoyaux peuvent être décondensés dans les embryons de *M. belari*.** Marquage au Hoechst de l'ADN contenu dans les embryons. Le pronoyau maternel est indiqué par une flèche blanche, le pronoyau mâle par une flèche verte. Les autres structures marquées par le Hoechst sont les globules polaires (A) Embryon gynogénétique dont seul le pronoyau maternel est décondensé, présence d'un seul globule polaire. (B) Embryon gynogénétique dont les pronoyaux maternels et paternels sont décondensés, présence de deux globules polaires. La barre d'échelle représente 10  $\mu$ m.

Pour vérifier cela nous avons filmé des embryons précoces de *M. belari* et les avons triés sur la base du nombre de pronoyaux décondensés présents dans l'embryon au stade une cellule. Les embryons ont ensuite été isolés et après leur développement le sexe des individus a été observé. Sur 65 embryons gynogénétiques, 65 ont donné des femelles et sur 15 embryons amphimixiques, 15 ont donné des mâles (Figure 29). Ce résultat suggère donc fortement que, au contraire de ce que Victor Nigon affirmait, seuls des mâles proviennent des embryons amphimixiques. Il apparaît donc qu'un père ne transmet son ADN qu'à ses fils et non à ses filles.

Nous avons par ailleurs pu observer qu'il est difficile de distinguer un embryon amphimixique au stade 1-cellule possédant deux pronoyaux (paternels et maternels) d'un embryon au stade deux cellules possédant chacune un noyau. Nous avons donc émis l'hypothèse que les embryons amphimixiques ne produiraient que des mâles, et que les observations de Nigon ont été faussées par la sélection d'embryons gynogénétiques au stade deux cellules comme des embryons amphimixiques avec deux pronoyaux. Le pourcentage d'embryons gynogénétiques étant très élevé, la probabilité d'avoir confondu ces embryons l'est tout autant.

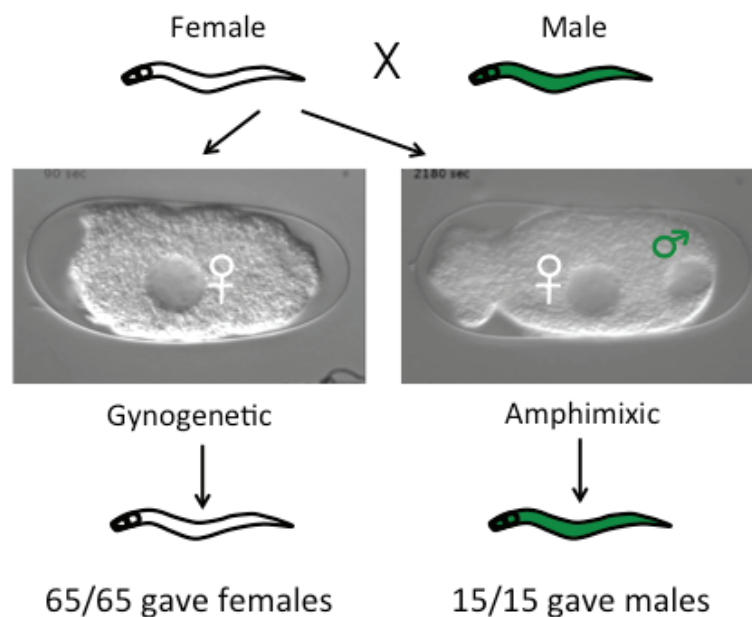


Figure 29: Observation de devenir des embryons en fonction de leur développement.

Les femelles produisent deux types d'embryons, un type gynogénétique où seul l'ADN maternel est décondensé et un type amphimixique où les deux ADN parentaux sont observés. Le nombre de pronoyaux décondensés est facilement observable en microscopie DIC. Les embryons sont ensuite triés selon leur type et leur sexe est analysé une fois que les individus sont devenus adultes. Sur 65 embryons gynogénétiques, tous ont donné des femelles, sur 15 embryons amphimixiques, tous ont donné des mâles.

Ce dernier résultat indique par ailleurs qu'il n'est pas possible de réaliser une étude de génétique classique chez *M. belari* puisque le mélange des génomes paternels et maternels ne se produit pas chez les descendants femelles. Il n'est donc pas possible d'étudier la dynamique du développement du zygote chez cette espèce grâce à des techniques de génétique classique. En revanche, l'observation d'une espèce produisant des mâles qui, d'un point de vue génétique n'apportent visiblement pas d'avantage à leur mère nous a paru intrigante. En effet, la production de mâles a un coût pour les femelles, et ce coût n'est pas contrebalancé par le fait que les mâles répandent leurs gènes à la génération suivante. Les femelles produisent donc des individus qui ne leur permettront pas d'accroître la transmission de leurs gènes au sein de la descendance. J'ai donc réalisé des expériences complémentaires pour confirmer l'absence de transmission des gènes paternels aux femelles. En collaboration avec Pierre-Henri Gouyon nous avons ensuite tenté de comprendre pourquoi les femelles *M. belari* produisent des mâles bien que ce ne soit pas avantageux pour elles. J'ai pu ensuite tester expérimentalement certaines prédictions du modèle. Cette collaboration a donné lieu à la rédaction d'un manuscrit permettant de déterminer le sex ratio évolutivement stable chez cette espèce. Pour cela un modèle mathématique de théorie des jeux, basé sur des observations biologiques réalisées pendant ma thèse, a été élaboré.

## 1.9 Publication en révision

### Why would parthenogenetic females systematically produce males who never transmit their genes to females?

Manon Grosmaire<sup>1</sup>, Caroline Launay<sup>1</sup>, Marion Siegwald<sup>2</sup>, Marie-Anne Félix<sup>3</sup>, Pierre-Henri Gouyon<sup>2</sup> and Marie Delattre<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biology and Modeling of the Cell, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS, Inserm, UCBL, 69007 Lyon, France

<sup>2</sup> Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

<sup>3</sup> IBENS, Département de Biologie, Ecole Normale Supérieure, CNRS, Inserm, PSL Research University, 75005 Paris, France

#### Summary

In pseudogamous species, females use the sperm of males from another species to activate their oocytes and produce females, without using the sperm DNA. Here we report a novel reproductive strategy found in the pseudogamous nematode *Mesorhabditis belari*, which produces its own males at low frequency. We find that the 8% of *M. belari* males are necessary to fertilize all oocytes but pass on their genes only to males, and never to females. Thus, the production of males has no impact on the genetic diversity of females. Using game theory, we show that the production of males at low frequency constitutes an efficient strategy only if sons are more likely to mate with their sisters. We validate this prediction experimentally by revealing a mating preference between siblings. We uncover the remarkable reproductive strategy

of parthenogenetic females that pay the cost of producing males while males do not spread their genes.

## Results

Sperm-dependent parthenogenesis, also called pseudogamy, is a reproductive strategy in which females use the sperm of males, usually from another species, to activate their oocytes. Later, the sperm DNA does not participate to the development of the zygote, leading to 100% females in the progeny (1, 2). In the nematode family Rhabditidae, a very special type of pseudogamy is found within the *Mesorhabditis* genus, where the sperm required to activate the oocytes does not come from males of other species: in pseudogamous species of *Mesorhabditis*, both females and males are produced. This unique reproductive strategy is characterized by a low frequency of males in the population (below 10%). Following up on initial descriptions by Belar in the 1920's (3) and Nigon in the 1940's (4), we recently reisolated strains of pseudogamous *Mesorhabditis belari* (initially named *Rhabditis belari* (4, 5)) and revisited the results obtained by Belar and Nigon. Here we show that females arise strictly by gynogenesis, without incorporating the male DNA into their genome, while males arise strictly by amphimixis of the parental genomes. Thus, the genes of males are never passed on to females in this species. From the point of view of the gene pool of females, the fitness return on males is null. We next ask why females that have the ability to reproduce by gynogenesis would still produce males which do not spread their genes to females. Using game theory, we find that the production of less than 10% of males constitutes an evolutionary stable strategy to optimize the number of

oocytes that can be fertilized, as long as the males have a mating preference for their sisters. Transient or cyclical production of males by parthenogenetic females have been described in several species (6). In all cases, the production of a sexual form leads to exchange of genetic material, thus introducing genetic diversity in an otherwise clonal population (7–11). To our knowledge, the reproduction of pseudogamous *Mesorhabditis* nematodes is a novel and unexpected strategy in which parthenogenetic females produce a low percent of males while males do not provide any genetic diversity to the females.

### ***Mesorhabditis belari* females produce gynogenetic and amphimictic embryos**

We chose to focus on *M. belari* JU2817 (Orsay, France) as our reference strain (see Methods). In our laboratory conditions, females of this strain produced approximately 8% of males during their entire life (mean=7,72%, standard deviation=2,2, count of 3743 F1s, see Methods) (Table S1). We also confirmed that females could not reproduce in the absence of males. Last, we found a level of embryonic lethality of only 5% (see Methods), ruling out the possibility that the low percentage of males was due to high lethality of male embryos.

In *M. belari* females, as in other Rhabditids nematodes, oocytes are arrested in prophase of meiosis I and meiosis resumes after fertilization (12). Using DIC recordings and staining of DNA and microtubules from fixed samples, we found, as described by Belar and Nigon (3, 4),  $2n=20$  chromosomes in female oocytes (Figure S1) (4). We also found that females produced two types of embryo (Figure 1A and 1B). (i) The most common class were gynogenetic embryos ( $n= 227$  out of 258 fixed embryos), which extruded a single polar body and displayed a single pronucleus, containing 20 chromosomes before the first embryo mitosis (Figure S1); in this case

the oocyte followed a single round of meiotic division and the male DNA entered the oocyte cytoplasm but did not decondense; as suggested by Belar, we found that despite the absence of sperm DNA decondensation, the centrosomes that were provided by the sperm formed robust asters that eventually contacted the female pronucleus to establish the first mitotic spindle (ii) A few % of the embryos (n=31 out of 258 fixed embryos) were amphimictic: two polar bodies were observed, two pronuclei containing 10 chromosomes each were formed before mitosis (Figure S1) and asters were seen associated with the male DNA; in this case, the oocyte followed two rounds of meiotic divisions and the haploid male DNA decondensed and mixed with the haploid female DNA. Both categories of embryos were diploid, because the lack of paternal DNA was compensated by the lack of one female meiotic division in gynogenetic embryos.

Regardless of the status of the male DNA, the sperm is required to activate all the oocytes and to provide centrosomes to the zygote in the *M. belari* species.

### **The DNA of *M. belari* males is only transmitted to sons**

After observing this first cell division by DIC time-lapse imaging (Figure 1B), we recovered embryos of each category and let them develop on an agar plate. We found that 65 out of 65 gynogenetic embryos (harboring a single pronucleus) developed as females. In contrast, we found that 15 out of 15 amphimictic embryos (showing two pronuclei) developed as males (Figure 1C). Instead, Nigon had found that 7 out of 10 of the amphimictic embryos gave rise to males and 3 to females. Based on this result, he suggested that amphimictic embryos produced 50% of males and 50% of females, as in regular amphimictic species (4).



To confirm our finding that amphimictic embryos did not produce females, we took advantage of a single-nucleotide polymorphism (SNP) within the RNAP2 locus of different strains of *M. belari* to genotype males and females. We crossed females from the JU2817 strain (with a G/G genotype) with males from the JU2859 strain (with a C/C genotype) and vice versa. We genotyped the F1s from different crosses and found that, irrespective of the cross direction, all F1 females had the same allele as their mother (n=539), while the F1 males were all heterozygotes C/G (n=49) (Table1). This result indicates that *M. belari* female individuals arise strictly by gynogenesis, while amphimixis produces only males. Because one-cell embryos with two pronuclei are difficult to distinguish from 2-cell stage embryos under low magnification, we believe that Nigon missorted three female embryos. However, we cannot exclude that the strain that was used by Nigon behaved differently as those that we had recently isolated.

Our results imply that *M. belari* JU2817 females produce males whose DNA is never transmitted to females. Our results also suggest that the male genome is diluted in their sons at each generation with the mother genome, thus in principle converges with the female genome. However, males could transmit preferentially the alleles of their father to their sons, thus preventing this dilution. To test this hypothesis, we genotyped the sons of heterozygous males. To this end, we first generated heterozygote males C/G at the RNAP2 locus by crossing JU2817 G/G females to JU2859 C/C males. Heterozygote males were then crossed to JU2859 C/C females. We found that out of 48 F1 males, 24 were C/C and 24 were C/G. Thus, heterozygote males transmitted the RNAP2 alleles of their parents at the same frequency. This result suggests that there is no global bias in the transmission of the paternal genome in *M. belari*, although we cannot exclude that some loci and/or

chromosomes are subjected to a male meiotic drive. Overall, we propose that male genes are progressively converging with the female genes in males, and because they will never be found in females, there is no selection on most of the male genes. From the point of view of the gene pool of *M. belari* females, the fitness return on males is 0.

### **A male proportion of 8% is sufficient to maximize the brood size of females**

We next asked whether a proportion of 8% males in the population was sufficient to obtain the largest possible brood size, either the number of possible male mating or the number of transferred sperm cells being potentially a limiting factor. In other words, we asked whether this low percentage of males was optimal for the fitness of the population. To answer this question, we crossed 20 females with an increasing number of males and counted the total number of progeny that were produced during the reproductive period (Figure 2 and Table S2). We found that batches of 20 females that had been crossed to a single male produced in average approximately 490 descendants, while batches of 20 females that had been crossed to two males reached an average of 800 descendants. Importantly, further increasing the number of males per females did not increase the mean brood size of females. This result demonstrated firstly that the mean production of a single female could not exceed 40 embryos, even when males and sperm cells were in excess. In agreement with this finding, we showed that the mean number of sperm cells stored in the spermatheca of females ranged from 64 to 226 sperm cells (mean = 134.72 +/- SD = 47.52, n=25 females), largely exceeding the number of embryos produced during the reproductive period of females. Secondly, our result showed that a single male was not sufficient to fertilize and transfer enough sperm cells to 20 females and therefore, male percentage was a

limiting factor in the population. However, two males for 20 females, i.e. 9% of males, were already sufficient to obtain the maximum brood size. This result strongly suggested that a single male could produce between 400 and 800 sperm cells during its reproductive period. Overall, we concluded that the production of 8% amphimictic (male) embryos was sufficient to maximize the brood size of *M. belari* JU2817 females.

### **Evolutionary stable strategy for the sex ratio in *M. belari***

The interesting peculiarity of this system is that the genes present in a male will never be in a female again. From the point of view of the genes of females, the fitness return from sons is equal to 0. Thus, production of sons might be of interest for a female only if its sons mate with its daughters (to ensure that a maximum of eggs is fertilized) and do not mate unrelated lineage of females (to which they do not transmit any DNA). Because gynogenetic females could theoretically be fertilized by males of another species, we asked under which conditions should *M. belari* gynogenetic females produce their own males and in which proportion? To answer this question, we developed a game theory model. We show below that the *M. belari* reproductive strategy cannot be maintained in large populations under panmixis, suggesting that *M. belari* females should be isolated from the others either by physical distance (i.e the descendants do not move much before mating and mate with their siblings) or by their behavior (i.e males prefer mating with their sisters rather than with unrelated females).

In the model, the proportion of sons produced by a female will be called the sex ratio and noted  $x$ . The basic hypothesis of the model is that the progeny of a female constitutes a patch (or deme) of size  $k$ , which exchanges a fraction of  $m$

migrants with other demes (here this migration rate can also be interpreted like a rate of mating with unrelated females if the isolation is behavioural rather than geographical). Males and females are supposed to migrate equally. The fitness  $W(x, x^*)$  of a female playing a sex ratio  $x$  in a population where the others play a sex ratio  $x^*$  is computed as the number of fertilized eggs that her daughters produce. The evolutionary stable strategy (ESS) will be found by searching the value of  $x^*$  such that  $\forall x \neq x^*, W(x, x) < W(x, x^*)$ . The function  $W(x, x^*)$  reaches its maximum when  $x = x^*$ .

We first developed an analytical model (i). We explored the ESS sex ratio considering that the males are produced in order to ensure that at least one male will be present in the deme of the daughters, supposing that one male will be enough to make all eggs fertile. Second, we explored the ESS sex ratio using computer simulation (ii), taking into account that each male produces a finite number of spermatozoa.

*(i) The analytical model: unlimited sperm.*

Within the deme constituted by the progeny of female playing  $x$ , the sex ratio after migration is:  $\bar{x} = m x^* + (1 - m)x$  so that  $d\bar{x}/dx = 1 - m$

The probability that there is no male in the deme is  $(1 - \bar{x})^k$  and in the other demes (their number is supposed to be much larger than 1 so that the influence of the sex ratio of female  $x$  can be neglected once her progeny is dispersed) is  $(1 - x^*)^k$ .

The fitness of female  $x$  is then:

$$W(x, x^*) = k(1 - x) \{ (1 - m) [1 - (1 - \bar{x})^k] + m [1 - (1 - x^*)^k] \}$$

Which leads to an evolutionary stable proportion of females:

$$(1 - x^*) = \sqrt[k]{1/[1 + k(1 - m)^2]}$$

In a panmictic population with infinite migration ( $m=1$ ), the stable sex ratio is equal to 0, because a female has no advantage to produce sons if they mate mostly with the daughters of unrelated females without passing on their DNA. This would secondarily lead to population extinction. However, with decreased migration between demes, the stable sex ratio of the population increases and females do stably produce sons. We found that in order to explain the observed sex ratio of 0.08, it is necessary to suppose a migration rate of less than 0.4 between demes. The curve being relatively flat, migration rates between 0 (no migration) and 0.4 are compatible with the observed sex ratio (Figure 3A).

(ii) *The computer simulation model: limited sperm.*

In order to take into account that a single male cannot fertilize an infinite number of oocytes (Figure 2A), we simulated the different probabilities of having a certain number of males per deme. Each male produces a limited number of sperm cells, noted  $n$ . Using simulations, we found the same dependency of sex ratio on migration, although at a given dispersal rate, limiting sperm increases slightly the ESS proportion of males (Figure 3A). For example, a sex ratio of 0.08 is explained by a dispersal rate of 0.15 if the sperm is not limiting, and of 0.3 if sperm limitation is taken into account.

We next distinguished between dispersal and mating preference of males for their sisters. Preference of males for their sisters (ranging from 1= no preference, to 9= prefer their sisters 9 times more often) had a strong impact on the stable sex ratio (Figure 3B). For instance, even if the dispersal rate was very high (0.9), the sex ratio could reach 0.08 if males chose their sisters as a mating partner 9 times more often than unrelated females, while in the absence of mating preference the sex ratio dropped to 0. Hence, *M. belari* females have an advantage of producing males only if

the males are more likely to mate with their sisters, either because of a lack of dispersal, or by an active choice of males or females towards their siblings.

### ***M. belari* favors sib-sib mating**

We next experimentally tested the mating preference of *M. belari* individuals. We had previously observed that in our laboratory conditions, crosses between few males and females that had been isolated randomly from a mixed population were not yielding any progeny in about half of the crosses. We thus tested the possibility that males or females would preferentially mate with individuals that were born from the same mother, and may not yield any progeny when their partners were born from another female. To this end, we isolated single gravid females from the *M. belari* JU2817 strain on plates and performed crosses between 5 females coming from one mother with 2 males coming from the same mother (siblings) or with 2 males coming from another mother (non-siblings). We performed 50 crosses of each category and repeated the experiment 3 times. We found that 117 out of 150 sib-sib crosses were successful, which was statistically higher than the 73 out of 150 successful crosses obtained from non-siblings ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2$  test) (Figure 4 and Table S3). These results demonstrated that, as suggested by the mathematical model, *M. belari* individuals prefer mating with their siblings.

### **Conclusion**

While pseudogamous species can cope with the lack of paternal DNA, they still rely on a sperm cell to activate their oocytes and most likely to inherit centrosomes for embryo development. Indeed, except for some strict parthenogenetic species in which centrosomes form *de novo* after egg activation, the centrosomes are provided by the

sperm at fertilization in all animal species that have been studied so far (13). Due to these developmental constraints, pseudogamous females must spend energy for the search of males from another species (1, 2, 14). We have shown that upon identical developmental constraints, the reproductive strategy of *M. belari* consists in producing just enough of its own males. Such strategy may avoid competition for males with females of another species. However, because these males do not transmit their DNA to females, there is no direct advantage to a female (or to her genes) in producing males if they do not enhance their genetic diversity through crosses and if they fertilize mostly the daughters of others without passing on their genes. The only advantage for a sperm-dependent parthenogenetic female to regularly produce males is to ensure that a maximum of its oocytes will be fertilized. We found that because there is a strong mating preference between siblings, the production of less than 10% of males by parthenogenetic females constitutes an efficient reproductive strategy.

Among the known pseudogamous species that use the sperm from another species to reproduce, the production of few males by the pseudogamous females themselves has not been systematically ruled out. In some cases, the existence of rare males has even been reported but interpreted as abnormal events (15, 16). Further investigations will therefore be needed to find out whether convergent evolution as led to the emergence of the remarkable reproductive strategy found in *M. belari* outside of the *Mesorhabditis* genus.

To our knowledge, the production of males by parthenogenetic species has been systematically interpreted as developmental errors (because they males are found very rarely) (17) or has been associated with the advantage of mixing parental genomes (6). Thus, cyclical parthenogens combine the advantages of both sexual (mixing genomes) and asexual (clonal expansion) reproduction (7–11). The case of

*M. belari* shows however that the production of sexual forms cannot be systematically interpreted as a strategy to enhance the genetic diversity of the species.



## **Material and Methods:**

### *Strain isolation and maintenance*

Nematodes were isolated from soil and rotting vegetal matter and were identified as *Mesorhabditis belari* based on their morphology, geographic occurrence, crosses between strains and sequencing of the ITS2 locus (Genbank accession number MH142258). Strain JU2817 was started from one gravid female isolated from a rotten apple on 20 Oct 2014 in Orsay, France (GPS 48.70200, 2.17282). Strain JU2859 was started from one gravid female isolated in a soil and leaf litter sample collected on 6 Jun 2015 in the Botanic Garden, Cambridge (UK) (GPS 52.19255, 0.1281). We chose JU2817 as our reference strain.

Strains were maintained on Nematode Growth Media and *E. coli* OP50 at 20°C, following the procedure adopted for the maintenance of *C. elegans* (18). Their life cycle takes around 7 days at 20°C. Males are morphologically distinguishable from females because they are much smaller, have a reduced motility and a characteristic male tail.

### *Measurement of embryonic lethality*

A single gravid female was isolated and allowed to lay eggs for 24 hours. We counted the number of laid eggs, and 4 days later the number of larvae. We scored 1005 embryos from 79 females and found 50 dead embryos, corresponding to approximately 5 % embryonic lethality.

### *Sex ratio measurements*

As previously described for *C. elegans*, we found that *M. belari* larvae can be synchronized after an L1 arrest. Briefly, a mixed population of worms was collected in M9 and axenized by bleaching. Embryos were protected by their eggshell and resisted to the treatment. After hatching on plates without food, all worms were arrested at the L1 stage. After two days, L1s were fed with bacteria and restarted their development synchronously. Before they reached adulthood, virgins were isolated. Crosses between 5 virgin females and 2 virgin males were performed on individual plates. Because *M. belari* females lay eggs during approximately 10 days, parents were transferred to a fresh plate every two days, to avoid the mixing of F1 and F2 generations. We noticed however that frequent transfer of females reduced the size of the brood compared to females that were maintained on their original plate. After 4 days of development, when sexes were distinguishable, the number of F1 males and females was counted. We performed 38 crosses and obtained 3743 F1s, including 289 males, corresponding to a proportion of 7,72 % males, with a standard error of 2,2 (Table S1).

#### *Measurement of brood size*

From a synchronized population of worms (see above), 20 virgin females were isolated and 1 to 5 males were added onto each plate. In order to evaluate the entire brood per female, laid embryos were counted and eliminated every day until the end of the reproductive period (Table S2).

#### *Preference for sib-sib mating*

From a plate of worms from the JU2817 strain, gravid females were isolated on single plates and let to lay eggs. When F1 virgin females and males were distinguishable,

they were isolated and crossed with males or females from the same mother (siblings) or from another mother (non-siblings). Five females were crossed to two males and the number of crosses that gave rise to embryos was counted (Table S3).

#### *Embryo recording*

Gravid females were placed into a watch glass containing M9 and cut with a razor blade to release embryos. Embryos were next mounted in M9 on a 2% agarose pad between slide and coverslip, observed on a Carl Zeiss Axioimager A1 microscope with a 100X DIC lens (NA=1.4) and recorded using the time-lapse module of a digital Kappa Camera (DX4-285FW). After recording of the first division, embryos were sorted based on the number of pronuclei and recovered on agar plates. The embryos were allowed to hatch and develop until males and females could be distinguished.

#### *Embryo and gonad stainings*

To stain embryos and spermathecae, gravid females were cut on a polylysine-coated slide in a drop of 0.5 x M9 (diluted 1:1 in H<sub>2</sub>O). We fixed embryos using a freeze-cracking method, as previously described for *C. elegans* and other nematode species (19). Embryos were fixed during 15 min in -20°C methanol. A mouse anti-tubulin antibody (Sigma-Aldrich DM1a 1/200) and a donkey anti-mouse secondary antibody (DyLight 488, Jackson ImmunoResearch 1/1000) were incubated at room temperature during 45 min. Slides were finally incubated during 5 min in 1µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to reveal DNA. Labeled embryos were observed with a confocal microscope (LSM710, Zeiss). Z-stacks of embryos were acquired every 0,29 µm. To stain the spermatheca, females were cut to release the gonad and a drop of paraformaldehyde 3% was added onto the samples for 5 minutes. Next, a coverslip

was placed on the sample and frozen on a cold metal block. After removal of the coverslip, slides were immersed into methanol at -20°C and then rinsed and stained with Hoechst, following the same procedure as for embryo staining. Sperm cells inside the unique spermatheca of *M. belari* females were counted manually using an epifluorescent AxioImager A2 Zeiss microscope.

### *Worm genotyping*

Sanger sequencing revealed that two *M. belari* strains (JU2817 and JU2859) had an identical sequence of the RNAP2 gene except for a single single-nucleotide polymorphism (SNP). At this locus, the JU2817 strain displays a homozygote G/G genotype, while JU2859 has a C/C genotype. From synchronized worm populations (see above), virgin females and males from each strain were mated on single plates. PCR on whole worms were performed to genotype the F1s. We performed pyrosequencing of the F1s from JU2817 females crossed to JU2859 males. We used High Resolution Melt (HRM) sequencing to genotype the F1s from a cross between JU2817 males and JU2859 females. DNA was prepared using a Qiagen Type-it HRM PCR kit and a Qiagen Rotorgene following the instructions of the supplier.

### *Models*

The analytical model is shown in Appendix 1. The simulation was written in Python and is available upon request.

## References

1. L. W. Beukeboom, R. C. Vrijenhoek, Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. *J. Evol. Biol.* 11, 755–782 (1998).
2. J. Lehtonen, D. J. Schmidt, K. Heubel, H. Kokko, Evolutionary and ecological implications of sexual parasitism. *Trends Ecol. Evol.* 28, 297–306 (2013).
3. K. Belar, in *Die cytologie der merosperme bei freilebenden rhabditis-arten* (1923).
4. V. Nigon, Modalités de la reproduction et déterminisme du sexe chez quelques nématodes libres. 11, 1–105 (1949).
5. V. M. Nigon, M. A. Felix, History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook*, 1–91 (2017).
6. M. Hartfield, Evolutionary genetic consequences of facultative sex and outcrossing. *J. Evol. Biol.* 29, 5–22 (2016).
7. D. E. Allen, M. Lynch, The effect of variable frequency of sexual reproduction on the genetic structure of natural populations of a cyclical parthenogen. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 66, 919–926 (2012).
8. M. J. Carter, J.-C. Simon, R. F. Nespolo, The effects of reproductive specialization on energy costs and fitness genetic variances in cyclical and obligate parthenogenetic aphids. *Ecol. Evol.* 2, 1414–1425 (2012).
9. M. Neiman, K. Larkin, A. R. Thompson, P. Wilton, Male offspring production by asexual *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand snail. *Heredity*. 109, 57–62 (2012).
10. C. L. Dudgeon, L. Coulton, R. Bone, J. R. Ovenden, S. Thomas, Switch from sexual to parthenogenetic reproduction in a zebra shark. *Sci. Rep.* 7, 40537 (2017).
11. C.-P. Stelzer, The cost of sex and competition between cyclical and obligate parthenogenetic rotifers. *Am. Nat.* 177, E43–53 (2011).
12. M. A. Miller *et al.*, A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science*. 291, 2144–2147 (2001).
13. M. Delattre, P. Gonczy, The arithmetic of centrosome biogenesis. *J Cell Sci.* 117, 1619–30 (2004).
14. D. Schley, C. P. Doncaster, T. Sluckin, Population models of sperm-dependent parthenogenesis. *J. Theor. Biol.* 229, 559–572 (2004).
15. D. K. Lamatsch *et al.*, Morphology, testes development and behaviour of unusual triploid males in microchromosome-carrying clones of *Poecilia formosa*. *J. Fish Biol.* 77, 1459–1487 (2010).

16. M. Narbel-Hofstetter, [Comparative cytology of the parthenogenetic species *Luffia ferchaultella* Steph. and the bisexual species *L. lapidella* Goeze (Lepidoptera, Psychidae)]. *Chromosoma*. 12, 505–552 (1961).
17. C. J. van der Kooi, T. Schwander, On the fate of sexual traits under asexuality: On the fate of sexual traits under asexuality. *Biol. Rev.* 89, 805–819 (2014).
18. S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77, 71–94 (1974).
19. S. Riche *et al.*, Evolutionary comparisons reveal a positional switch for spindle pole oscillations in *Caenorhabditis* embryos. *J. Cell Biol.* 201, 653–662 (2013).

## **End notes**

This work has been supported by a grant from the PEPS CNRS (from 2014 to 2015) and by a grant fellowship to MG from the French ministry of research (from 2014 to 2018). MD and MAF designed the experiments. PHG designed the model and performed the simulations together with MS. MG, CL and MD performed the experiments. MG, MAF, PHG and MD wrote the manuscript.

**Table 1. Females come from gynogenesis and males from amphimixis.**

*M. belari* JU2817 are homozygous G/G at a RNAP2 locus, while *M. belari* JU2859 are homozygous C/C at the same locus. JU2817 females were crossed to JU2859 males and vice versa (crosses 1-3 or crosses 4-8, respectively) and their entire progeny was genotyped. For all crosses, while males always presented a heterozygous combination of the parental alleles, females always harboured the genotype of their mothers.

		Homozygous G/G		Homozygous C/C		Heterozygous G/C	
		Female	Male	Female	Male	Female	Male
Female G/G x Male C/C	Cross #1	91	0	0	0	0	3
	Cross #2	23	0	0	0	0	0
	Cross #3	106	0	0	0	0	10
Female C/C x Male G/G	Cross #4	0	0	23	0	0	3
	Cross #5	0	0	167	0	0	18
	Cross #6	0	0	49	0	0	4
	Cross #7	0	0	42	0	0	4
	Cross #8	0	0	38	0	0	7



## Figure legends

### **Figure 1. Two types of embryo are produced by *Mesorhabditis belari* females.**

(A) Images from a representative amphimictic and a gynogenetic embryo during the reformation of the pronuclei fixed and stained with an anti-tubulin antibody (in green) and with Hoechst to label DNA (in magenta). White arrowheads point towards the centrosomes. Note that in the amphimictic embryo, only one aster is visible on this focal plane. Polar bodies are shown with a white star and male DNA is shown with a blue arrowhead. Out of 258 one-cell embryos scored during pronuclei reformation, only 31 showed two pronuclei. In gynogenetic embryos, the male DNA stays highly condensed, the female pronuclei has captured the centrosomes and only one polar body is visible. Scale bar is 5  $\mu\text{m}$ . (B) Still images from DIC recordings of representative amphimictic or gynogenetic embryos of *M. belari*. The male (blue arrowhead) and female (orange arrowhead) pronuclei are followed from fertilization until the first cell division. Scale bar is 5  $\mu\text{m}$ . (C) *M. belari* embryos were sorted based on the number of polar bodies and pronuclei observed on DIC recordings, as shown in (B). 65 gynogenetic embryos always gave rise to 65 females (in orange), while 15 amphimictic embryos gave only males (in blue).

### **Figure 2. The percentage of males in the population is sufficient to maximize the brood size of females.**

20 females were crossed with a different number of males (from 1 to 5, corresponding to 4.7 to 20 % of males) and left on plates until the end of the female reproductive period. The total number of embryos produced (Y axis) was counted for  $n$  crosses per

condition. The mean value and standard error are shown for each condition.

Corresponding numerical values are shown in Table S2.

**Figure 3. Evolutionary stable sex ratio calculations indicate that a non-zero male proportion arises from a low dispersal rate and/or a high preference for sib-sib mating.**

(A) The evolutionary stable sex-ratio (proportion of males) is shown as a function of the dispersal rate between demes with 40 individuals per deme and 400 spermatozoa per male, when the sperm is limiting (grey curve) or not limiting (black curve). In a panmictic situation (dispersal rate of 1), no males are produced. Decreasing the dispersal of individuals between demes allows the production of a low percent of males. (B) Influence of the preference for sib-sib mating in the model with sperm limitation, with 40 ovules produced per female and 400 spermatozoa per male. For a strong dispersal rate, the high mating preference between siblings allows the maintenance of few males in the population.

**Figure 4. Sib-sib mating preference**

We performed 50 crosses between siblings and 50 crosses between non-siblings and counted the % of crosses that gave a progeny (Y axis). The experiment was repeated 3 times. The mean value and standard error are shown for each condition.

Corresponding numerical values are shown in Table S3.

**Figure S1.  $2n=20$  chromosomes are found in both types of embryos**

The upper panels show a representative amphimictic and a gynogenetic embryo during the reformation of the pronuclei fixed and stained with an anti-tubulin

antibody (in green) and with Hoechst to label DNA (in magenta). The lower panel shows a zoom on the chromosomes and a Z projection of the entire nuclei. Chromosomes are shown black. Chromosomes have been numbered arbitrarily. Note that because the amphimixic embryo is slightly younger than the gynogenetic embryo, chromosomes are less condensed and less individualized. Each nucleus of amphimixic embryos show 10 chromosomes, while the single pronucleus of gynogenetic embryos have 20 chromosomes. Scale bar is 5 microns.

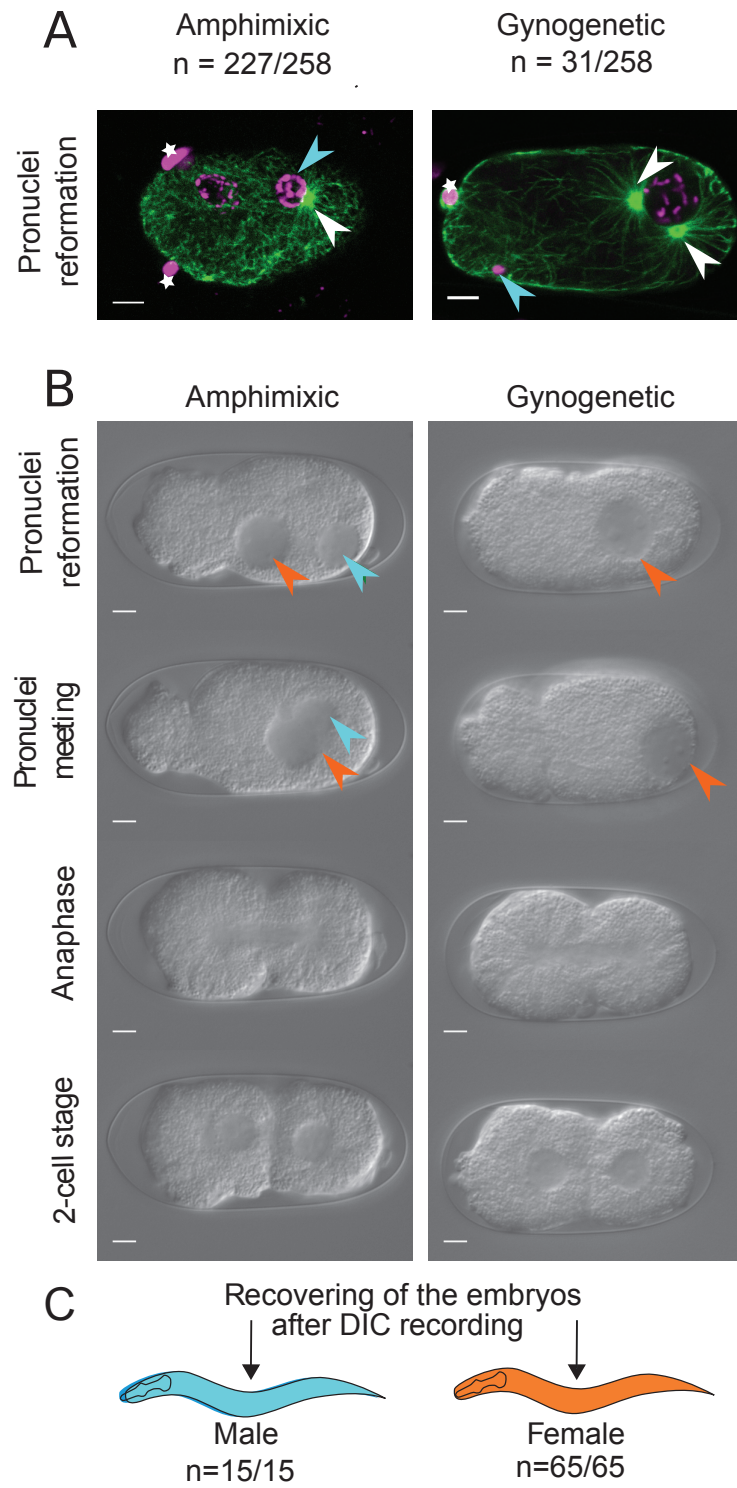


Figure 1

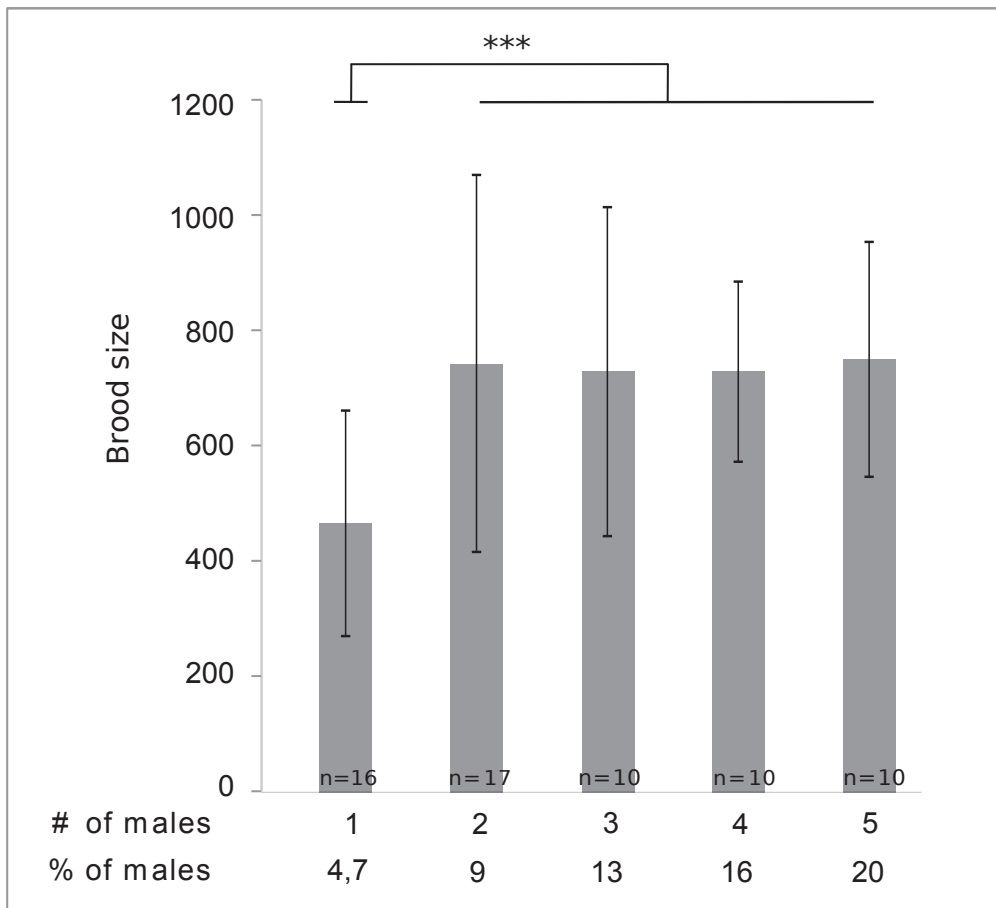


Figure 2

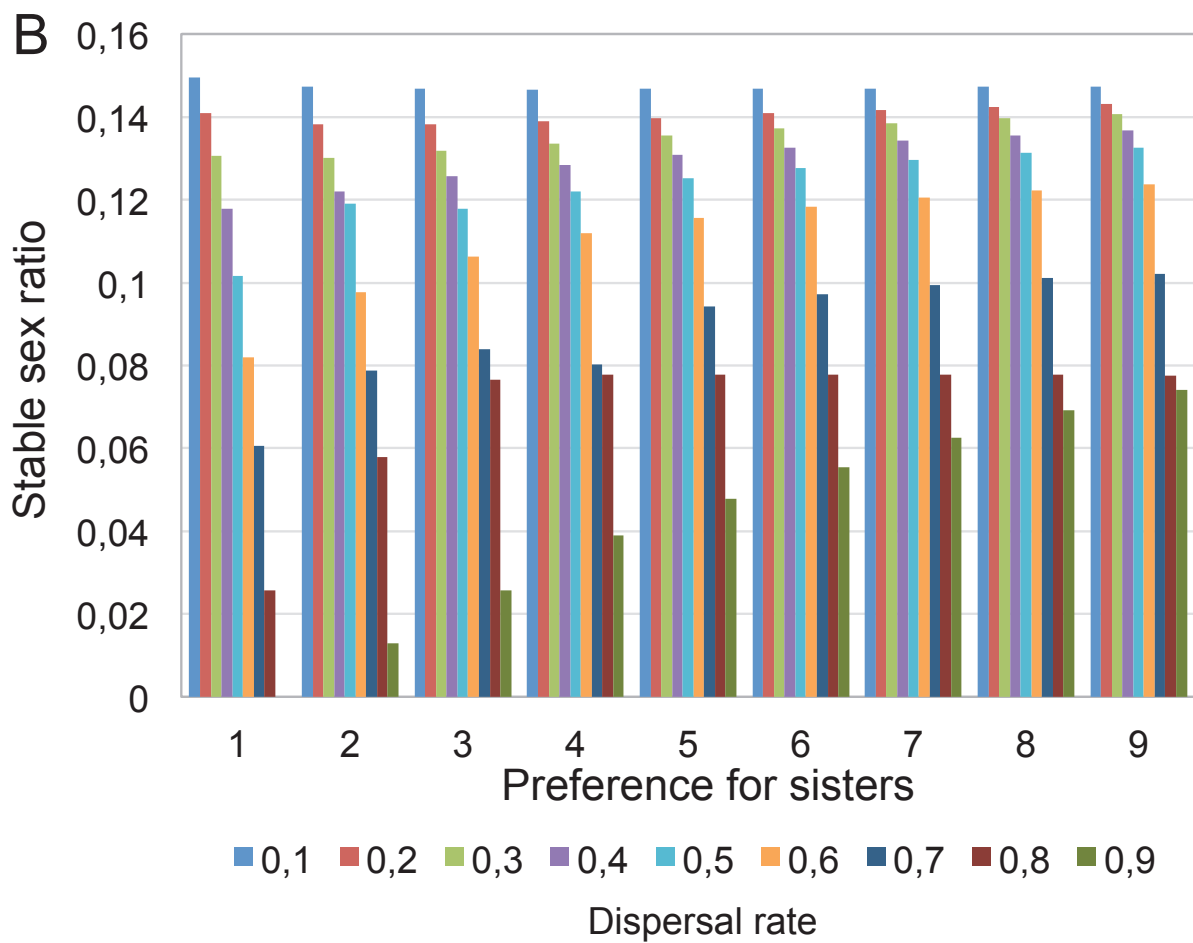
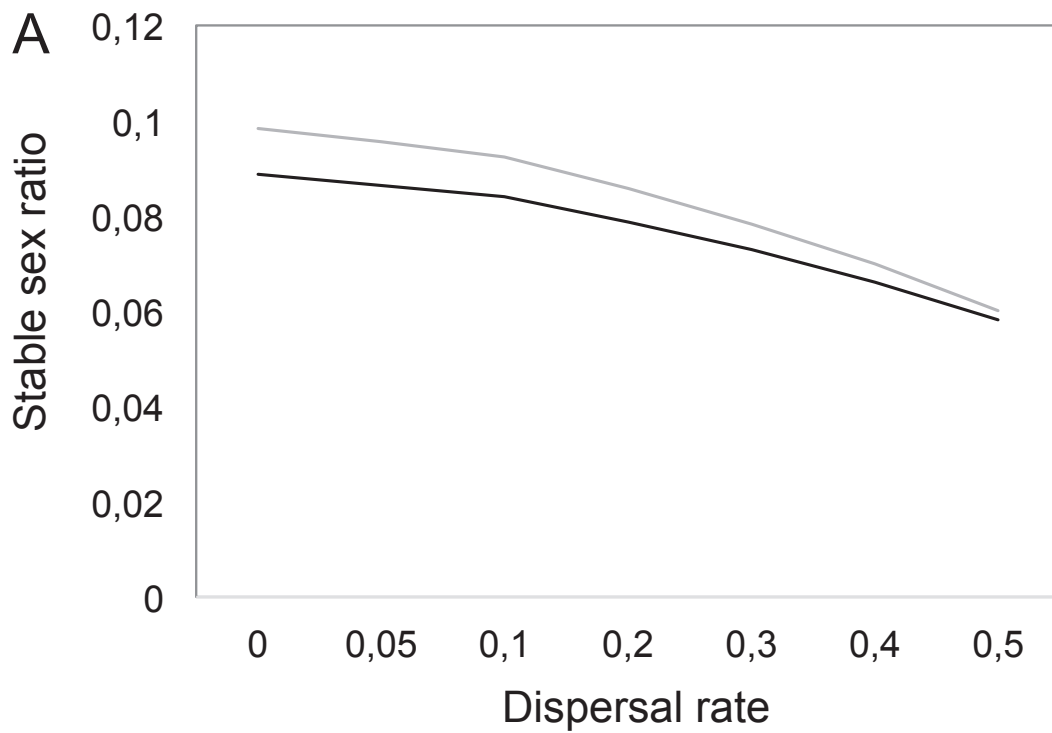


Figure 3

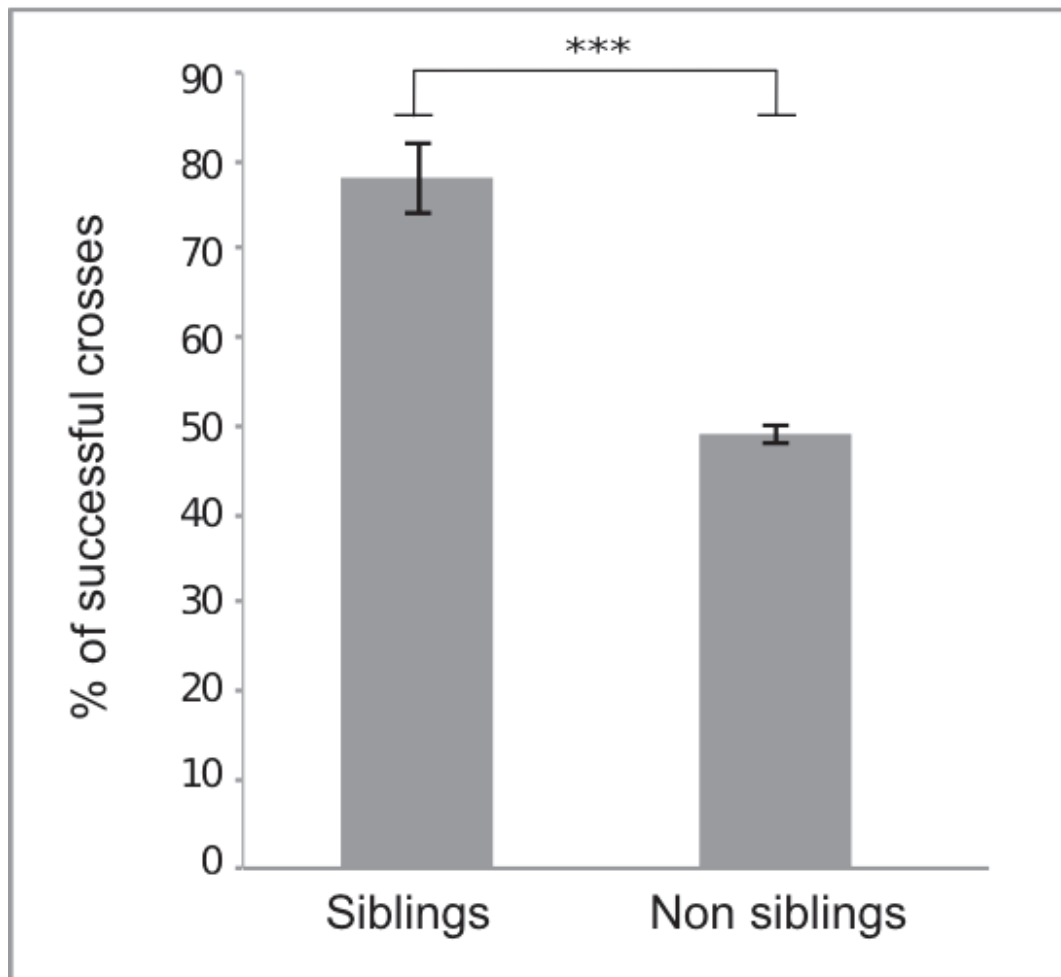
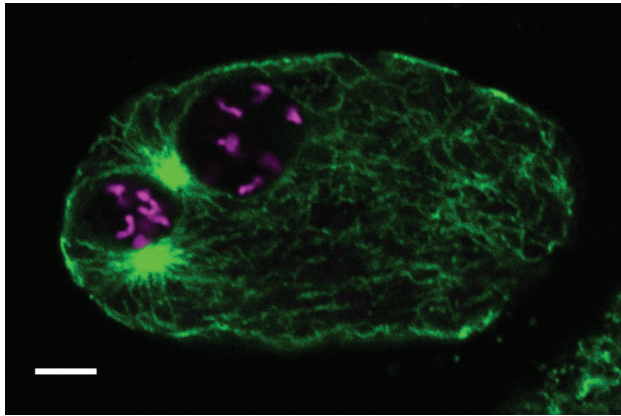


Figure 4

Amphimictic embryo



Gynogenetic embryo

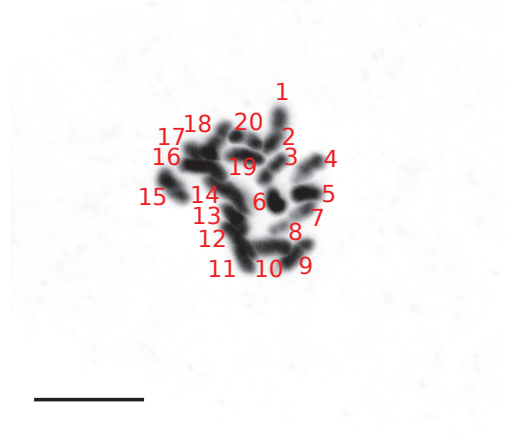
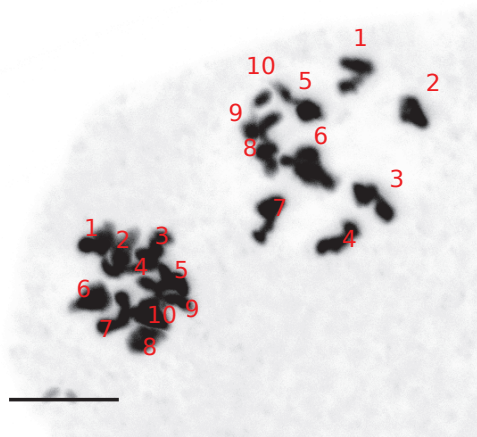
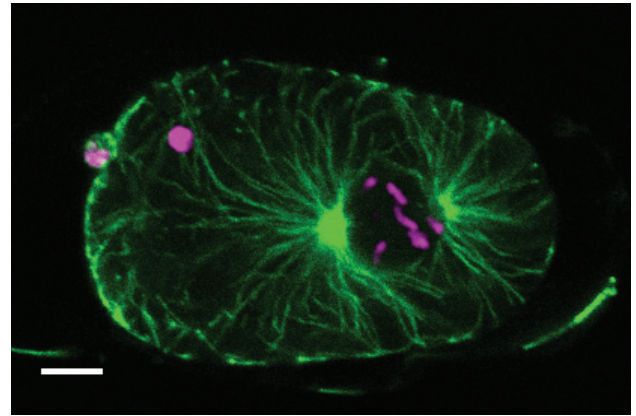


Figure S1



Crosses	Total progeny	Female progeny	Male progeny	Male percentage
#1	115	106	9	7,8
#2	47	45	2	4,3
#3	149	136	13	8,7
#4	193	178	15	7,8
#5	92	83	9	9,8
#6	51	49	2	3,9
#7	138	125	13	9,4
#8	162	150	12	7,4
#9	236	220	16	6,8
#10	51	46	5	9,8
#11	118	110	8	6,8
#12	78	71	7	9,0
#13	88	80	8	9,1
#14	80	74	6	7,5
#15	103	93	10	9,7
#16	63	62	1	1,6
#17	90	81	9	10,0
#18	204	190	14	6,9
#19	35	32	3	8,6
#20	45	40	5	11,1
#21	131	121	10	7,6
#22	62	55	7	11,3
#23	58	54	4	6,9
#24	34	31	3	8,8
#25	128	120	8	6,3
#26	80	77	3	3,8
#27	205	192	13	6,3
#28	76	69	7	9,2
#29	65	61	4	6,2
#30	95	87	8	8,4
#31	50	46	4	8,0
#32	111	103	8	7,2
#33	118	107	11	9,3
#34	96	87	9	9,4
#35	52	49	3	5,8
#36	30	29	1	3,3
#37	132	120	12	9,1
#38	82	75	7	8,5
Total	3743	3454	289	7,7

Table S1: Male percentage in the *M. belari* strain.

38 crosses between 5 virgin females and 2 males were performed on individual plates. The number of males and females F1s was counted when sexes were distinguishable.

Crosses	20 ♀ x 1 ♂		20 ♀ x 2 ♂		20 ♀ x 3 ♂		20 ♀ x 4 ♂	
#1	1	431	1	366	1	856	1	862
#2	2	819	2	444	2	648	2	552
#3	3	0	3	875	3	697	3	705
#4	4	0	4	769	4	1132	4	863
#5	5	372	5	1105	5	461	5	1023
#6	6	789	6	1046	6	296	6	603
#7	7	191	7	596	7	800	7	726
#8	8	511	8	671	8	1261	8	626
#9	9	386	9	950	9	965	9	1001
#10	10	544	10	272	10	548	10	698
#11	11	158	11	284				
#12	12	0	12	746				
#13	13	709	13	1346				
#14	14	705	14	1315				
#15	15	324	15	452				
#16	16	499	16	1108				
#17	17	534	17	909				
#18	18	0						
#19	19	621						
#20	20	249						

Table S2: Incidence of the % of males on the total brood size of females  
 20 virgin females were isolated on plates and crossed with 1 to 5 males.  
 The total number of embryos laid by the females was counted.  
 Crosses that did not yield any embryo were not taken into account for the calculation of the mean brood size.

Experiment	Siblings crosses			Non siblings crosses		
	Total	Successful	%age of succesful crosses	Total	Successful	%age of successful crosses
#1	50	37	74	50	24	48
#2	50	41	82	50	24	48
#3	50	39	78	50	25	50
Total	150	117	78	150	73	49

Table S3: Preference for sib-sib mating

Gravid females were isolated on single plates. F1 females were crossed with F1 males from the same mother (sib-sib) or from another female (non siblings crosses).

The number of crosses that yielded a progeny (successful cross) was counted.

The experiment was repeated 3 times and each time, 50 crosses of each category were performed.

### **1.10 Conclusion**

Ce travail a permis de mettre en évidence le rôle de la préférence entre frères et sœurs dans le maintien d'un sex ratio stable. Cependant, l'origine de cette préférence n'est pas déterminée. Elle pourrait par exemple être génétique ou environnementale. D'autres expériences ont été réalisées dans le but de déterminer quelle pouvait être cette origine. Les résultats obtenus sont détaillés dans le chapitre suivant.

## 2. Validation de la préférence entre frères et sœurs pour la reproduction

La préférence pour le croisement a pu être vérifiée avec d'autres conditions de croisements entre individus frères et sœurs et individus non frères et sœurs pris au hasard sur une boîte. Pour le croisement entre des individus non frères et sœurs, les nématodes ont été synchronisés avant d'être croisés entre eux. Trois jours après l'ajout de nourriture, les vers ont été triés selon leur sexe et placés sur de nouvelles boîtes. Dans ce cas, soit une femelle et un mâle ont été placés ensemble sur la boîte, soit 5 femelles et un mâle ont été déposés sur la même boîte.

Pour le croisement entre des individus frères et sœurs, des femelles gravides provenant d'une population mixte ont été isolées sur boîte et laissées pendant 2 jours. Après 2 jours, les femelles ont été retirées et les embryons ont été laissés pour se développer. Au bout de 4 jours, les vers provenant d'une même femelle ont été triés selon leur sexe et déposés ensemble (1 femelle et 1 mâle ou 5 femelles et 1 mâle) sur une nouvelle boîte. Les individus ont été laissés sur la même boîte pendant une semaine et le nombre de croisements ayant donné une descendance a été compté. Dans ce cas, les individus sont considérés comme frères et sœurs car ils proviennent de la même mère, mais nous ne pouvons pas savoir si cette mère a été fécondée par un seul ou plusieurs mâles, ils peuvent donc ne pas partager le même père. De plus, la distance génétique qui sépare deux mères n'est pas connue car nous sélectionnons les mères au hasard sur leur boîte d'origine.

Le taux de réussite pour des croisements entre 1 femelle et 1 mâle passe de 2% pour des individus non frères et sœurs (n= 57 croisements, résultats présentés dans la partie I) à 14% pour des individus frères et sœurs (n= 50 croisements). Le taux de réussite pour des croisements entre 5 femelles et 1 mâle passent de 40% pour des individus non frères et sœurs (n= 50 croisements, résultats présentés dans la partie I) à 72% pour des individus frères et sœurs (n= 50 croisements) (Figure 30).

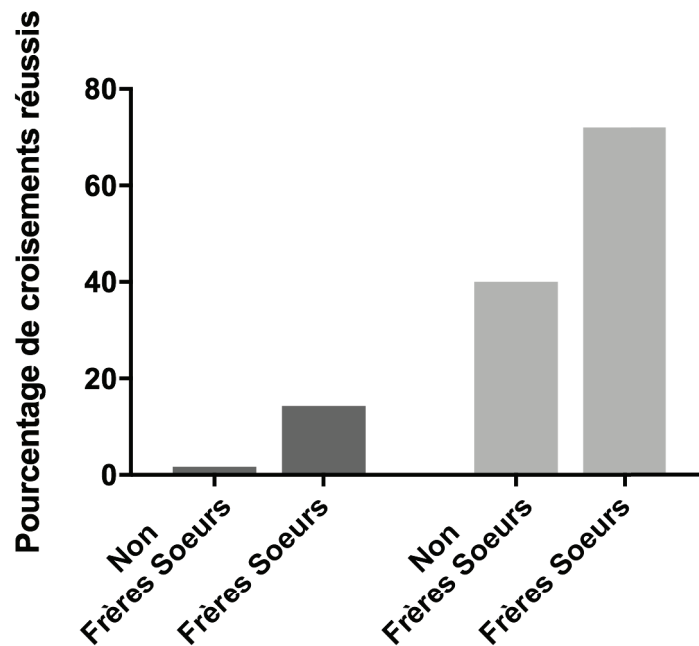


Figure 30: Les croisements entre frères et sœurs semblent produire une descendance plus souvent que des croisements effectués sans lien de parenté.

Les graphes représentent le pourcentage des croisements ayant donné une descendance pour des croisements réalisés entre frères et sœurs ou avec des individus pris au hasard. A gauche les croisements ont été réalisés entre 1 femelle et 1 mâles, à droite les croisements ont été réalisés entre 5 femelles et 1 mâles.

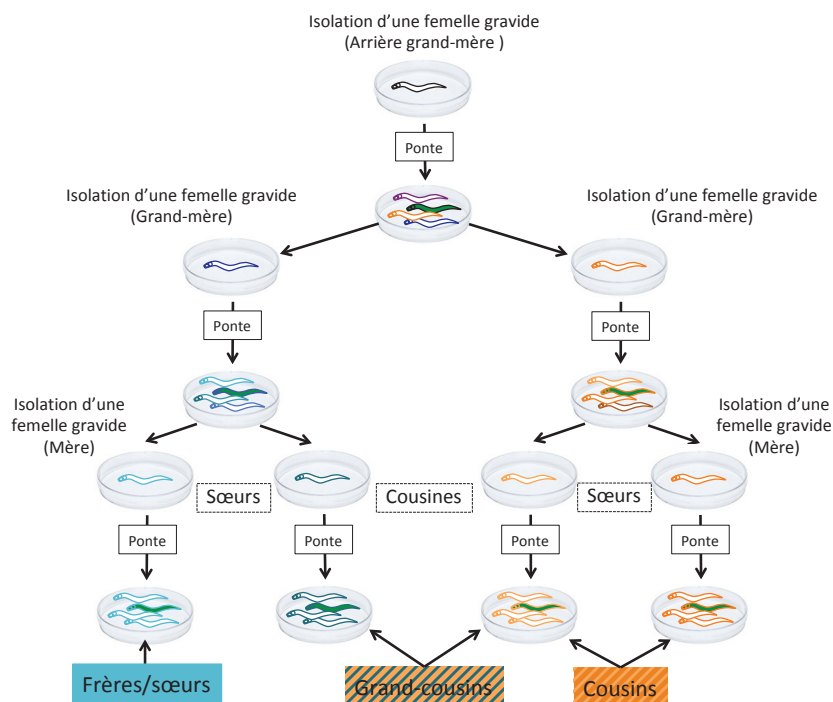
Ce résultat ainsi que le résultat concernant les croisements entre 5 femelles et 2 mâles (présenté dans le manuscrit) indiquent une préférence entre les frères et sœurs pour la reproduction mais il n'est pas possible de savoir à quoi est dûe cette préférence de partenaires sexuels. La préférence pourrait s'établir entre individus partageant le même patrimoine génétique ou bien grâce à une empreinte non génétique (par exemple phéromonale) déposée par la mère lors de la ponte.

Or dans ce cas, nous ne connaissons pas la distance génétique qui sépare deux individus considérés comme non frères et sœurs étant donné que nous sélectionnons des mères gravides au hasard sans connaître leur lien de parenté. Afin de déterminer quel mécanisme est à l'origine de cette préférence nous avons donc réalisé deux autres types d'expériences en contrôlant précisément le lien de parenté entre les mères isolées. Nous avons systématiquement mesuré le taux de réussite pour de multiples croisements réalisés en parallèle entre 5 femelles et 2 mâles provenant de la même mère ou 5 femelles provenant d'une mère, et 2 mâles provenant d'une autre mère. Sachant que la stabilité du sex ratio est un facteur clé

du maintien de la population, nous avons aussi mesuré dans certains cas le pourcentage de mâles issus de ces croisements.

## 2.1 La distance génétique ainsi que l'environnement semblent jouer un rôle dans la préférence entre frères et sœurs

Afin de vérifier l'impact de l'environnement sur la préférence entre les frères et sœurs nous avons décidé de croiser ensemble des cousins et des cousines. Ce croisement permet de vérifier le taux de préférence entre des individus que l'on peut considérer comme proches génétiquement, mais qui n'ont pas grandi dans le même environnement. Le croisement entre des individus cousins a été réalisé en isolant la descendance de deux femelles issues de la même mère puis en croisant les filles d'une femelle avec les fils de sa sœur (figure 31).



**Figure 31: Obtention des individus pour les croisements entre individus cousins et grand-cousins.** Les individus frères et sœurs partagent la même mère, les individus cousins partagent la même grand-mère, les individus grand-cousins partagent la même arrière grand-mère. Les individus sont isolés à chaque génération à partir d'une population contenant plusieurs mâles et femelles. Les individus partagent donc la même mère mais pas forcément le même père.

Dans cette expérience, nous considérons que d'un point de vue génétique les individus cousins sont aussi identiques que des individus frères et sœurs. En revanche leur mère ayant été isolée avant leur ponte, ils ne partageaient pas le même environnement avant d'être croisés. J'ai réalisé dans ce cas 2 expériences indépendantes de plusieurs croisements et j'ai comparé le taux de réussite des croisements entre cousins et entre frères et sœurs. Sur un total de 136 croisements entre des individus frères et sœurs, 114 ont donné une descendance soit un taux de réussite de 84%. Les individus cousins ont, quant à eux, produit une descendance dans 96 croisements sur 139 réalisés, soit un taux de réussite de 69%. Le pourcentage de mâles dans la descendance de chaque croisement a aussi été mesuré. Dans ce cas les individus frères et sœurs ont produit en moyenne 12,8% de mâles alors que les individus cousins ont produit en moyenne 10% de mâles dans leur descendance. Par la suite des individus grands cousins ont été croisés entre eux, des résultats similaires aux croisements entre cousins ont été obtenus, sur 48 croisements, 34 ont donné une descendance (Figure 32). Le pourcentage de mâles pour ces croisements n'a pas été mesuré.

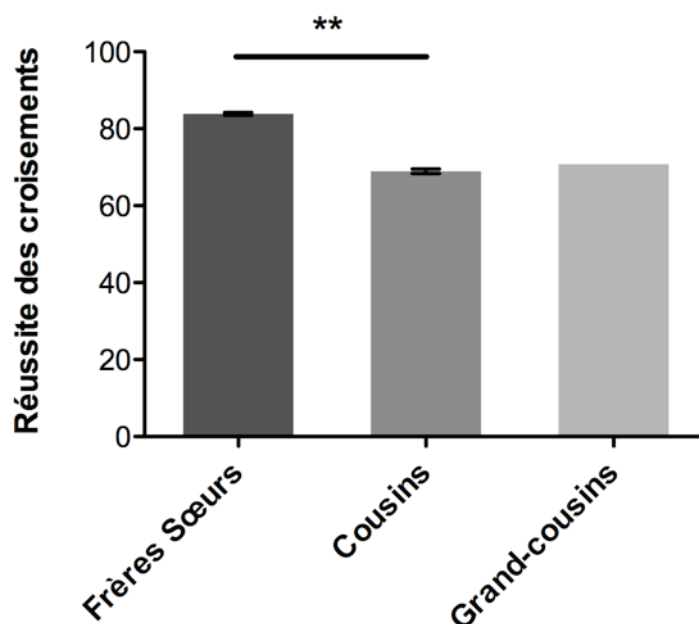
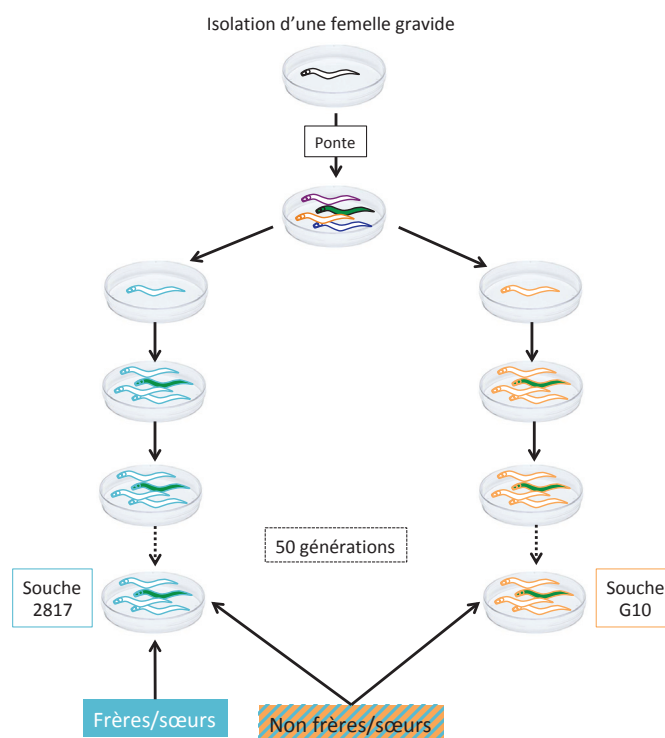


Figure 32: Les croisements entre frères et sœurs produisent plus souvent une progénie que ceux entre cousins ou grand-cousins.

Les graphes représente le pourcentage des corismeents qui ont donné une progénie en fonction des liens de parenté entre les parents. Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne. (T-test, P-value < 0,009)



Afin de vérifier l'impact de la distance génétique dans la préférence entre frères et soeurs, nous avons réalisé des croisements entre des individus provenant de populations dérivées depuis 50 générations au moins. Ce croisement a été réalisé avec la population utilisée dans le laboratoire pour les différentes expériences menées pendant ma thèse, appelée 2817, et une autre population issue de la population 2817, appelée G10 et qui a été maintenue séparément de la population 2817 pendant plus d'un an. Le cycle de vie de *M. belari* étant de 7 jours, nous considérons donc que les individus de ces deux populations ont été séparés depuis au moins 50 générations et que leurs individus peuvent potentiellement être plus distants d'un point de vue génétique que des frères et soeurs, même si nous ne connaissons pas les des taux de mutations/sélection dans cette espèce (Figure 33).



**Figure 33: Deux femelles ont été isolées à partir d'une même mère.**  
A chaque génération, les individus sont transférés sur de nouvelles boîtes pour donner la génération suivante et ce pendant plus d'un an. Les individus frères/sœurs proviennent de la même mère, les individus non frères/sœurs proviennent de deux mères dont les ancêtres ne se sont pas rencontrés depuis au moins 50 générations.

Pour ces croisements j'ai réalisé trois expériences indépendantes. Des croisements entre des femelles 2817 et des mâles G10 ou des mâles G10 et des femelles 2817 ont été effectués. Le taux de réussite de ces croisements à été comparé à celui d'individus issus de la même mère, et donc frères et sœurs, pour chaque population. Sur un total de 100 croisements entre des individus frères et sœurs, 84 ont donné une descendance, en revanche sur 110 croisements réalisés entre des individus issus de populations différentes 58 ont produit une descendance. Les individus frères et sœurs ont donc produit une descendance dans 84% des cas alors que les individus non frères et sœurs en ont produit une dans 53% des cas (Figure 34A). Par ailleurs, pour 2 expériences sur 3 j'ai aussi mesuré le pourcentage de mâles dans la descendance des deux types de croisement, les frères et sœurs produisent en moyenne 12,4% de mâles alors que les individus non frères et sœurs en produisent 6,6% pour le même nombre de descendants totaux en moyenne (Figures 34B et 34C).

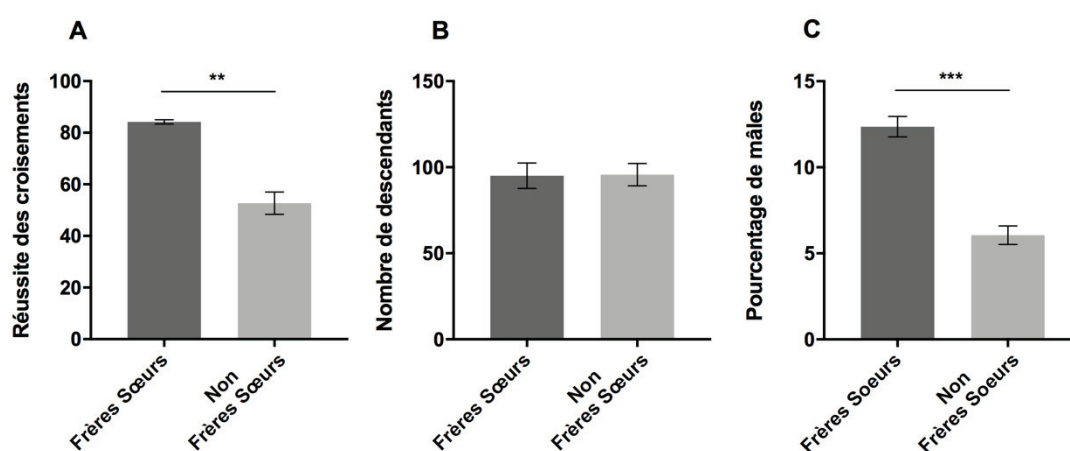


Figure 34: Les croisements entre individus frères et sœurs produisent plus de mâles en proportion dans la descendance.

(A) pourcentage des croisements réalisés ayant donné une descendance (unpaired T test, p-value = 0,002) (B) nombre de descendants moyens produits pour chaque type de croisement (unpaired T test, p-value = 0,94) (C) pourcentage de mâles moyen produit dans la descendance pour chaque type de croisement (unpaired T test, p-value < 0,0001). Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne calculé à partir du pourcentage de mâles ou du nombre de descendants produit par chaque croisement.

L'ensemble de ces résultats indique donc que deux types de barrières existent quant à la reproduction d'individus non frères et sœurs. Alors que l'on peut

considérer que la différence génétique entre frères et sœurs et entre cousins est négligeable, le taux de réussite des croisements entre cousins ou grands cousins est légèrement plus faible que celui des frères et sœurs. Ceci indique que pour les frères et sœurs le plus fort taux de réussite est dû au fait d'avoir grandi dans le même environnement, condition que n'ont pas partagée les cousins et les grands cousins. En revanche, le taux de réussite pour des croisements entre cousins et grands cousins reste plus élevé que celui de croisements entre individus séparés depuis 50 générations. Ce résultat indique qu'en plus de l'environnement, un facteur génétique ou une faible distance génétique pourraient permettre la reconnaissance entre individus pour la reproduction. Par ailleurs, les croisements entre individus apparentés produisent plus de mâles en proportion dans la descendance que ceux entre individus plus distants.

## **2.2 Les individus frères et sœurs produisent plus de mâles dans leur descendance**

J'ai par ailleurs mesuré le pourcentage de mâles dans la descendance des croisements entre les individus frères et sœurs et les individus non frères et sœurs pris au hasard. Pour cela, tous les 2 jours après avoir croisés 5 femelles et 2 mâles, et jusqu'à la fin de la ponte, les parents ont été changés de boîte. Les individus de la descendance ont été laissés sur ces boîtes pour se développer et une fois leur sexe identifiable j'ai compté le nombre de mâles et de femelles présents. Sur les 3 répétitions de l'expérience, le pourcentage de mâles dans la descendance a été mesuré pour 2 de ces répétitions. Les résultats montrent une production de mâles plus importante dans la descendance des individus frères et sœurs que dans celle des individus non frères et sœurs malgré le fait que le nombre de descendants au total (mâles et femelles) soit approximativement le même. En effet, les frères et sœurs ont produit en moyenne 112 individus dans leur descendance dont 14 étaient des mâles alors que les individus non frères et sœurs ont produit 115 individus en moyenne dont 7 étaient des mâles. Les frères et sœurs produisent donc 12,5 % de mâles dans leur descendance alors que les non frères et sœurs 6,5% (Figure 35)

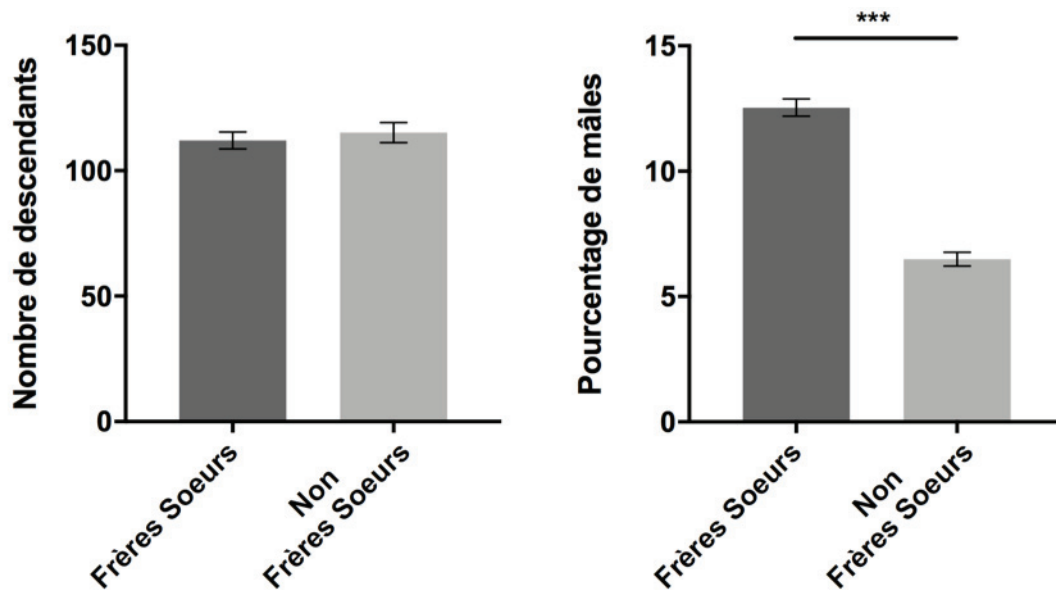


Figure 35: Les croisements entre individus frères et sœurs produisent plus de mâles en proportion dans la descendance.

(A) nombre de descendants moyens produits pour chaque type de croisement (unpaired T test, p-value = 0,55) (B) pourcentage de mâles moyen produit dans la descendance pour chaque type de croisement (unpaired T test, p-value < 0,0001). Les barres d'erreur représentent l'écart type à la moyenne calculé à partir du pourcentage de mâles ou du nombre de descendants produit par chaque croisement.

L'expérience de croisements entre 20 femelles et un nombre de mâles croissant (présentée dans la publication) a permis de montrer que les femelles produisent en moyenne 40 embryons au cours de leur vie. Or, lors des expériences présentées dans cette partie, le nombre de descendants est d'environ 100 pour 5 femelles. Ce résultat reviendrait à dire que les femelles pondent environ 20 embryons chacune. Cette différence peut s'expliquer par le fait que pour compter les mâles et les femelles dans la descendance, les parents sont déplacés de boîte en boîte tous les 2 jours. On peut considérer que cette manipulation supplémentaire provoque un stress ou qu'elles blessent les femelles, ce qui pourrait altérer leur fécondité.

Par ailleurs, l'effet de l'ajout de phéromones sur le taux de réussite des croisements a pu être analysé. Pour cela le taux de réussite des croisements entre individus non frères et sœurs avec et sans phéromones (résultat présentés dans la le paragraphe « caractérisation de la souche pseudogame *M.belari* ») a été mesuré. La totalité des croisements avec (n=45) ou sans phéromones (n=20) a donné une

descendance. Ce résultat indique que l'ajout de phéromones n'entraîne pas une baisse du taux de réussite des croisements. En effet, les croisements ont été réalisés entre 20 femelles et 2 mâles et la présence de 20 femelles permet à tous les croisements de donner une descendance sans ajout de phéromones. Une explication probable au fait que les croisements entre 20 femelles et 2 mâles donnent une descendance systématiquement serait que la probabilité pour deux individus d'être frères et sœurs augmente avec le nombre d'individus sélectionnés. Il serait donc possible que les femelles fécondées prioritairement pour ce type de croisement soient les sœurs des mâles déposés sur la boîte. Dans ce cas, l'ajout de phéromones pourrait avoir différents types d'effet sur la baisse du pourcentage de mâles observée lors de l'ajout de phéromones. Soit les phéromones n'entraînent pas la perte de reconnaissance entre frères et sœurs mais entraîne une baisse de la proportion de mâles dans leur descendance. Soit les phéromones entraînent une perte de la reconnaissance entre frères et sœurs, favorisant ainsi le croisement d'individus non frères et sœurs, entraînant comme nous avons pu le voir une baisse de la proportion de mâles dans la descendance.

### 3. Conclusion et perspectives

En reprenant les travaux de V. Nigon, nous n'avons pas retrouvé les mêmes résultats. Nottament, nous avons pu révéler que les embryons amphimixiques ne produisent que des mâles, et non une moitié des mâles et l'autre des femelles. Ce résultat est similaire à celui obtenu par Belar. Il est possible que nous n'étudiions pas la même souche que V. Nigon, ou bien que les conditions différentes de culture que nous avons utilisées soient à l'origine de ces différences. Ces résultats nous ont amené à essayer de comprendre comment un tel système de reproduction pouvait permettre la perpétuation de l'espèce. L'article présenté dans cette partie permet de répondre à cette question. En parallèle, des résultats préliminaires et non publiés apportent d'autres conclusions intéressantes.

#### 3.1 Des facteurs génétiques et environnementaux semblent avoir un impact sur l'efficacité de croisement

Le taux de réussite des croisements entre individus chez *M. belari* semble être dépendant d'une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques.

Les frères et sœurs acceptent de se croiser dans 80% des cas alors que les cousins et grands-cousins seulement dans 70% des cas. Malgré la faible différence entre les deux, ce résultat est supporté statistiquement, il semblerait donc qu'un facteur environnemental affecte la capacité de reconnaissance ou de reproduction entre les individus. Cette interprétation est dûe au fait que nous considérons la distance génétique entre des frères et sœurs et des cousins comme étant égale. La différence de préférence entre les frères et sœurs et les individus cousins semble indiquer que le fait d'avoir été pondu dans le même environnement renforce la préférence.

De plus, des individus dérivés depuis 50 générations acceptent encore moins de se reproduire entre eux, indiquant dans ce cas que la distance génétique jouerait un rôle supplémentaire dans la préférence pour la reproduction. Cependant, le taux de mutation/sélection chez l'espèce *M. belari* n'est pas connu, et nous ne pouvons donc pas affirmer que des individus cousins sont génétiquement identiques à des individus frères et sœurs. Il a été montré chez *C. elegans* que le taux de mutation est

de 1/génome/génération. Il serait intéressant à la fois de déterminer ce taux chez *M. belari* mais aussi d'effectuer des croisements entre individus dérivés depuis 10 ou 20 générations afin de comprendre l'impact de la distance génétique sur la préférence pour la reproduction entre individus. Afin de comprendre l'impact de l'environnement sur la préférence, nous pourrions par ailleurs laisser une même femelle pondre des mâles et des femelles sur une seule boîte puis éliminer les femelles de la boîte avant le stade reproductif et ajouter des femelles non sœurs des mâles toujours en présence. Ce système pourrait nous permettre de comprendre s'il est possible de « tromper » les mâles avec les phéromones déposées dans la boîte par leur mère et leurs sœurs. Dans ce cas, les mâles devraient féconder les femelles non apparentées de la même manière que des femelles apparentées.

### **3.2 Le nombre d'individus présents semble avoir un impact sur l'efficacité de croisement.**

Même si le nombre de mâles n'est pas changé, l'ajout de femelles supplémentaires lors d'un croisement entraîne un plus fort taux de réussite de ce croisement. Ce phénomène ne semble pas être du à la possibilité de se rencontrer puisque des tests effectués dans un espace de rencontre plus restreint n'ont pas permis d'augmenter le taux de réussite de ces croisements. Plus le nombre d'individus isolés pour le croisement augmente, plus la probabilité de mettre des frères et sœurs en présence les uns des autres est importante. Les croisements réalisés avec un plus grand nombre d'individus pourraient alors avoir un plus fort taux de réussite car des frères et sœurs acceptent plus de se croiser.

En revanche, des croisements réalisés avec 20 femelles et un seul mâle ont tous donné une descendance. La probabilité que toutes les femelles soient des sœurs du mâle en présence est très faible. Il est alors possible que la présence de nombreuses femelles augmente la quantité de phéromones dans le milieu et favorise l'intérêt des mâles pour des femelles même non sœurs. Il est aussi possible que le fait de se croiser avec une sœur puisse augmenter les chances de s'accoupler avec une partenaire non apparentée. Cependant, dans cette expérience, il est difficile de savoir si toutes les femelles sont fécondées ou seulement une partie.

Nous avons essayé de déterminer si les femelles étaient effectivement toutes fécondées, mais il est difficile de distinguer les femelles possédant une spermathèque remplie d'une spermathèque vide, car les spermatozoïdes sont si petits qu'ils sont difficiles à distinguer des granules lipidiques présents dans le tube digestif en DIC. De plus, nous avons tenté d'isoler les femelles au bout de 48h de croisement afin de voir combien de femelles pondaient, mais dans ce cas, nous ne pouvons pas déterminer si les femelles qui ne pondent pas n'ont juste pas encore été fécondées et l'auraient été si on les avait laissées plus longtemps en présence d'un mâle.

Il serait alors possible que seules quelques femelles apparentées au mâle soient fécondées. Dans ce cas la proportion d'embryons devrait augmenter avec l'ajout de mâles supplémentaires, augmentant la probabilité que les femelles trouvent un partenaire apparenté, et ceci n'a pas été observé. Afin de tester cela, nous pourrions réaliser des croisements entre 20 femelles et 2 mâles en étant certains qu'ils ne sont pas apparentés aux femelles. Si tous ces croisements réussissent alors nous pourrions conclure qu'un nombre de femelles important suffit à la réussite d'un croisement (dans ce cas il serait possible de déterminer à partir de quel nombre de femelles les croisements réussissent tous). Si tous les croisements ne fonctionnent pas alors nous pourrions conclure que la présence d'une ou plusieurs de leurs sœurs parmi les femelles présentes permet la réussite de tous les croisements (dans ce cas, nous pourrions déterminer quelle proportion de femelles « sœurs » est nécessaire pour que tous les croisements réussissent).

Nous avons montré qu'avec 20 femelles, le pourcentage de mâles nécessaire et suffisant à la production du maximum de descendants est d'environ 9%. Cependant, il est possible qu'un changement fin du pourcentage de mâles puisse jouer sur la taille de la descendance, il serait donc intéressant de moduler le pourcentage de mâles de manière à osciller faiblement autour du pourcentage de mâles obtenu dans la population. De plus, le pourcentage de 9% correspond à celui observé dans une grande population, mais nos résultats ont été obtenus avec 20 femelles seulement. Il serait alors intéressant de calculer le nombre de descendants produits lorsque beaucoup plus de femelles sont présentes, tout en faisant varier le pourcentage de mâles. Cette expérience pourrait permettre de comprendre si le



nombre de femelles joue sur la capacité des mâles à mieux ou moins bien féconder les femelles.

Pour finir, la préférence entre les frères et les sœurs a été observée dans des expériences où les croisements entre individus apparentés ou non sont effectués dans des boîtes différentes. Il serait intéressant de vérifier si cette préférence s'effectue tout de même lorsqu'un mâle est en présence à la fois de ses sœurs mais aussi de femelles non apparentées. Pour cela, étant donné qu'il est impossible de distinguer une femelle d'une autre, il faudrait identifier des SNPs différents entre les femelles et regarder la répartition de ces SNPs dans la descendance.

Les femelles semblent aussi pondre moins d'individus mais pas moins de mâles en proportion lorsqu'elles sont déplacées régulièrement de boîte en boîte, ceci pourrait provoquer un stress supplémentaire causant la production de moins d'individus. Nous avons eu tendance à observer que des femelles déposées seules sur boîte pouvaient ne pas pondre comparées à des femelles déposées en groupe sur une même boîte. Il semblerait aussi que la proportion de femelles ne pondant pas sur une nouvelle boîte augmente à mesure des générations. Plus les isolations ont lieu à chaque génération avant le début de la ponte, plus la proportion de femelles ne pondant pas est importante. L'absence de phéromones sur la nouvelle boîte pourrait forcer la femelle à ne pas pondre en raison de l'absence d'autres individus pouvant signifier la présence d'un environnement non favorable. Nous pourrions tester cette hypothèse en déposant des femelles gravides à chaque génération sur des boîtes ayant déjà accueilli une population. Dans ce cas, si les femelles gravides pondent plus que sur des boîtes ne contenant pas les phéromones, ceci pourrait indiquer que la présence d'autres individus sur la boîte constitue un signal favorable pour la reproduction.

### **3.3 L'impact de l'environnement sur le sex ratio reste inconnu**

Dans nos conditions, nous n'avons pas pu reproduire les résultats de Victor Nigon quant à la modulation du pourcentage de mâles. Il est possible que nous

n'étudiions pas la même souche que lui, et il est aussi possible que les conditions différentes de culture n'entraînent pas ces différences de modulation. En effet, Victor Nigon cultivait les nématodes sur lame porte-objet alors que nous les cultivons en boîte de Pétri en plus grande quantité, de plus les animaux n'étaient pas exposés aux mêmes températures que dans notre laboratoire et le milieu de culture ainsi que la source de nourriture n'étaient pas les mêmes que ceux que nous utilisons.

La modulation du pourcentage de mâles en fonction de la température est faible mais cependant pas inexistante dans nos conditions. Nous avons par exemple observé une plus grande proportion de mâles à des températures différentes de 20°C. Ces conditions pourraient provoquer un stress chez les femelles qui pourrait alors produire plus de mâles afin d'assurer la fécondation de toute la descendance femelle même si les conditions environnementales ne sont pas optimales.

L'objectif de ces manipulations était de trouver des facteurs environnementaux permettant d'augmenter la proportion de mâles dans un but pratique. En effet, le faible pourcentage d'embryons amphimixiques et donc de mâles dans l'espèce *M. belari* rend certaines expériences laborieuses, par exemple, le nombre de croisements qu'il est possible d'effectuer est limité par le nombre de mâles présents sur les boîtes, et la comparaison entre les deux types d'embryons est limitée par la présence d'un petit nombre d'embryons amphimixiques. N'ayant pas trouvé de condition permettant d'augmenter simplement le pourcentage de mâles, nous n'avons donc pas poursuivi nos investigations sur l'effet de la température sur le sex ratio. Il serait intéressant de tester d'autres stimuli environnementaux que la température afin d'essayer d'augmenter le pourcentage de mâles dans les populations. Par exemple, la source de nourriture peut changer le sex ratio chez certaines espèces, nous pourrions donc faire varier cette source. De plus, la découverte d'un facteur environnemental permettant de moduler de façon conséquente le pourcentage de mâles pourrait nous renseigner sur la cause du maintien d'un sex ratio stable dans cette espèce.

Lors des expériences de croisement, nous rassemblons au moins 5 femelles sur une boîte. Nous n'avons jamais obtenu de boîte de croisement ne contenant

aucun mâle dans la descendance. Cependant, nous ne pouvons pas savoir si toutes les femelles ou seulement une partie ont pondu quelques mâles. Il serait alors possible que dans la population, certaines femelles ne pondent pas de mâles, tandis que d'autres en produisent, ou bien que certaines femelles pondent peu de mâles tandis que d'autres en produisent beaucoup. Ce système est observé chez certaines espèces où en fonction de la fitness de leur partenaire ou de leur propre fitness, les femelles produiront une descendance avec un sex ratio différent. Il est difficile de réaliser une expérience permettant de répondre à cette question, car dans nos conditions de laboratoire, nous avons observé que dans 98% des cas, lorsqu'une femelle vierge était isolée sur une boîte, elle ne produisait ensuite aucun embryon, quelle que soit le nombre de mâles ajoutés. Pour contourner ce problème, nous pourrions croiser plusieurs mâles et femelles ensemble, puis isoler les femelles dès qu'elles sont fécondées, pour éviter qu'elles ne pondent sur la boîte de départ et qu'on ne sache pas à quelle femelle attribuer un potentiel fils. Ceci nécessiterait donc d'observer les croisements en direct puisqu'il n'est pas possible de savoir si une femelle est fécondée seulement en observant sa spermathèque.

### 3.3.1 Les pères ne transmettent pas de matériel génétique à leurs filles

Le système de reproduction de *M. belari* entraîne vraisemblablement la dilution du génome des mâles dans celui des femelles. En effet, lorsqu'un mâle produit une femelle il ne lui transmet pas son génome, et lorsqu'il produit un mâle il ne lui transmet que la moitié de son génome. On observe donc une dilution au demi du génome paternel à chaque génération dans la descendance mâle. Nous ne pouvons cependant pas exclure que certains cas de « paternal leakage » puissent exister, cependant en réalisant des films en DIC ainsi que des marquages de l'ADN sur des embryons nous n'avons jamais observé ce genre de phénotype. L'absence de transmission globale de matériel paternel a été vérifiée grâce à l'analyse de la répartition d'un SNP dans le gène de la RNAP2, le séquençage du génome complet de plusieurs parents et de leur descendance femelle nous permettrait de comprendre si ce cas pourrait tout de même survenir pour de petites parties du génome ou bien dans certaines conditions environnementales. Ce séquençage

pourrait révéler l'absence de transmission complète du génome, ou bien la transmission spécifique de certains sites, ou encore la transmission aléatoire de sites des pères à leurs filles. De plus, nous ne pouvons pas exclure que dans de rares cas, un embryon amphimixique puisse donner une femelle, ce phénomène pourrait participer à la diversité génétique au sein de l'espèce.

Malgré cela, nous avons identifié une espèce qui produit systématiquement des mâles alors qu'ils ne transmettent pas, dans la grande majorité des cas, leur génome à la descendance femelle. Notre travail a permis de montrer que ce système reste viable si ces mâles sont produits en petite proportion et s'il existe une préférence entre les frères et sœurs pour la fécondation.

# Résultats partie II

---

## 1. Exploration des mécanismes cellulaires du mode de reproduction pseudogames chez *M. belari*

### 1.1 Objectifs

Ces différentes observations nous ont amené à nous poser plusieurs questions sur les bases moléculaires et cellulaires qui régissent ce mode de reproduction. Durant ma thèse, j'ai donc exploré ces différentes questions :

1 - Quel est le déterminisme du sexe chez les espèces du genre *Mesorhabditis* ?

Le système de déterminisme du sexe chez les espèces pseudogames du genre *Mesorhabditis* nous est inconnu. Nous avons donc cherché à comprendre si ce système était basé sur la présence de chromosomes sexuels ou d'un autre type de facteurs.

2 - Comment se déroule la méiose chez les embryons gynogénétiques ?

Les femelles *M. belari* sont capables de produire deux types d'ovocytes subissant chacun une méiose différente. Chez les embryons amphimixiques la méiose est complète et donne un pronoyau haploïde alors que chez les gynogénétiques la méiose est incomplète et produit un pronoyau diploïde. Plusieurs systèmes permettant de maintenir la diploïdie sont connus, par exemple chez les espèces parthénogénétiques. Nous avons donc cherché à comprendre comment la diploïdie est maintenue chez cette espèce. De plus, nous ne savons pas si les deux types de méiose se produisent avec ou sans recombinaison chez cette espèce. La recombinaison ayant un impact important sur la dynamique du génome et la génétique de la population, nous avons aussi cherché à élucider cette question.

3 - Comment a évolué la pseudogamie au sein des *Mesorhabditis* ?

L'échantillonnage de différentes souches de *Mesorhabditis* nous a permis de découvrir plusieurs souches pseudogames mais aussi des souches gonochoriques, composées de 50% de mâles et de 50% de femelles. Chez les souches gonochoriques, la fécondation est nécessaire à la poursuite du développement embryonnaire, la méiose femelle produit toujours un noyau haploïde et l'ADN paternel se décondense à chaque fois. Ces espèces se reproduisent comme des espèces gonochoriques classiques avec 50% des embryons devenant des femelles et 50% des mâles. Nous avons donc cherché à comprendre comment était apparue la pseudogamie au sein du genre *Mesorhabditis*. Nous avons cherché à comprendre si certaines innovations étaient apparues chez les espèces gonochoriques sans permettre la pseudogamie, ou bien si toutes les innovations cellulaires et moléculaires nécessaires à l'émergence de la pseudogamie sont apparues directement chez les espèces pseudogames. Nous avons aussi cherché à comprendre si les différentes souches avaient la même stratégie lorsqu'elles étaient pseudogames, notamment au niveau de la dynamique de la population et du pourcentage de mâles.

#### 4 - Comment est contrôlé le destin de l'ADN paternel ?

En fonction du type d'embryon, l'ADN paternel restera condensé ou bien se décondensera et participera pour moitié au génome du zygote. Nous avons cherché à comprendre quelles étaient les étapes de la décondensation de l'ADN paternel chez *M. belari* pour comprendre comment l'ADN paternel pouvait rester condensé ou non. La compréhension de ce mécanisme pourrait apporter des connaissances générales sur la régulation de la chromatine.

L'exploration de ces différents mécanismes n'a pas donné de résultats aboutis. La multiplication des pistes d'étude a cependant permis d'obtenir de nombreux résultats préliminaires intéressants et de développer des outils utiles pour l'étude future de ce mode de reproduction.

## 1.2 Séquençage de différentes espèces du genre *Mesorhabditis*

Afin de répondre à ces différentes questions nous avons fait réaliser le séquençage et l'assemblage du génome de la souche pseudogame JU2817 ainsi que le séquençage de son transcriptome en collaboration avec l'équipe de Mark Blaxter. Nous avons aussi réalisé le séquençage du génome de deux autres souches de l'espèce *M. belari* (JU2856 et JU2859), ceci afin de comparer l'évolution des génomes de différentes souches de la même espèce. Nous avons par ailleurs séquencé le transcriptome d'une souche gonochorique de *Mesorhabditis longespiculosa* (DF5017). Ces données ont été obtenues à partir de population entière, quelque soit la souche. Pour cela les individus ont été amplifiés puis lysés et leur ADN a été purifié. Les données concernant *Mesorhabditis belari* ont donc été obtenues à partir d'une population mixte comprenant peu de mâles (environ 8%). Pour *Mesorhabditis longespiculosa* les données obtenues concernent une population composée de 50% de femelles et 50% de mâles.

De plus, nous avons séquencé le génome des mâles et des femelles séparément des espèces JU2817 et DF5017. Ce séquençage nous permettra de déterminer ce qui différencie les mâles des femelles d'un point de vue génomique chez deux espèces du même genre qui ne partagent pas la même stratégie de reproduction.

## 2. Exploration du déterminisme du sexe chez les espèces du genre *Mesorhabditis*

### 2.1 Vérification de l'absence de *Wolbachia* chez *M. belari*

Différentes espèces au sex ratio biaisé sont connues pour être infectées par la bactérie *Wolbachia*. Chez ces espèces, la présence ou l'absence du parasite détermine le sexe de l'hôte. A ce jour *Wolbachia* n'a été observée que chez les nématodes filaires, cependant il n'est pas impossible que *M. belari* soit infecté par

cette bactérie. Afin de vérifier si *M. belari* pouvait contenir Wolbachia, ce qui aurait pu expliquer le biais de sex ratio, j'ai réalisé un marquage à l'iodure de propidium sur des gonades de mâles et de femelles JU2817. L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques (ADN et ARN). Il permet de vérifier la présence d'ADN cytoplasmique, et donc la présence de Wolbachia, après traitement à la RNase. Le Hoechst permet aussi de marquer l'ADN de Wolbachia mais moins efficacement que l'iodure de propidium. Nous avons donc réalisé un double marquage Hoechst/Iodure de propidium afin de distinguer l'ADN nucléaire (marqué par les deux agents) de l'ADN cytoplasmique (marqué préférentiellement par l'iodure de propidium)

Ces marquages n'ont révélé aucune présence d'ADN cytoplasmique, contrairement à ce qui est observé chez des espèces de nématodes infectées par Wolbachia. De plus, l'analyse du génome de *M. belari* n'a pas révélé la présence de reads spécifiques au génome de Wolbachia. Nous pouvons donc dire que *M. belari* n'est pas infecté par Wolbachia et que le biais du sex ratio dans cette espèce n'est pas dû à la présence de la bactérie (figure 36).

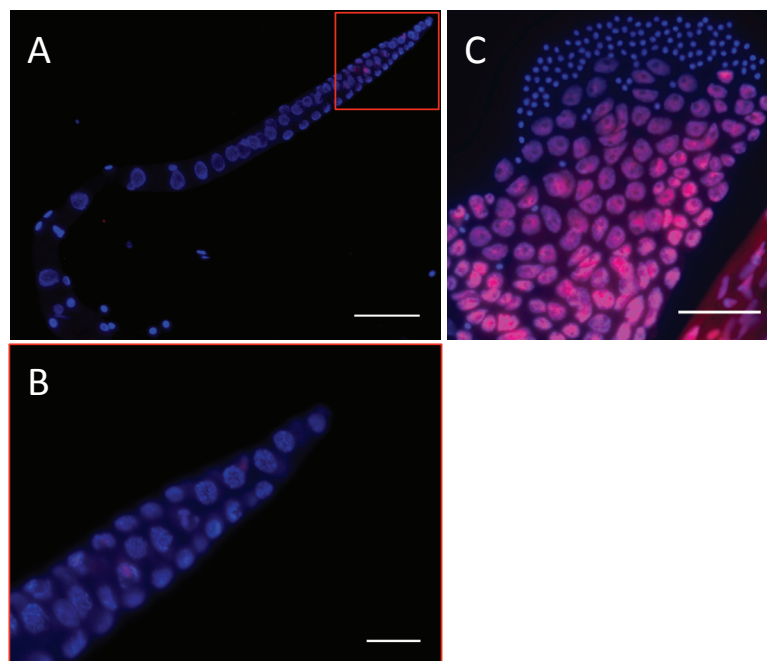


Figure 36 : Marquage du parasite Wolbachia à l'iodure de propidium dans les gonades de mâle et de femelle de *M. belari*.

L'ADN est marqué au Hoechst (bleu) et à l'iodure de propidium (rouge), seul l'iodure de propidium marque l'ADN cytoplasmique. (A) Gonade femelle, la barre d'échelle représente 50µm, (B) zoom sur



la partie encadrée en (A), la barre d'échelle représente 10µm, (C) gonade mâle, l'ADN nucléaire est marqué à la fois par le Hoechst et l'iodure de propidium, la barre d'échelle représente 25µm.

## 2.2 Recherche d'un chromosome sexuel chez *M. belari* par analyses cytologiques

Chez les nématodes, il existe deux systèmes de déterminisme chromosomique du sexe : i) les femelles possèdent deux chromosomes X et les mâles un seul, dans ce cas les femelles sont XX et les mâles XO; ii) les femelles possèdent deux chromosomes X et les mâles un chromosome X et un chromosome Y, dans ce cas les femelles sont XX et les mâles XY. Nous avons donc cherché à savoir par différents moyens si, dans cette espèce, le sexe était déterminé de manière chromosomique, et si oui, suivant quel type.

### 2.2.1 Tentative de réalisation d'un caryotype

Tout d'abord nous avons cherché à réaliser un caryotype pour les deux types d'embryons. Chez les nématodes, les chromosomes sont holocentriques, il est donc difficile de les différencier sur la base de leur forme mais le nombre de chromosomes présents dans ces deux types d'embryons pourrait nous renseigner sur la présence ou non d'un chromosome sexuel. Si le système est XX/XO, nous devrions observer un chromosome de plus dans les embryons gynogénétiques (au devenir femelle et donc XX) que chez les embryons amphimixiques (au devenir mâle et donc XO). Si le système est XX/XY, nous devrions observer le même nombre de chromosomes chez les mâles que chez les femelles. Pour ce faire, nous devons réaliser le caryotype sur des embryons au stade 1 cellule. Les embryons, passés ce stade, se développent tous de la même manière, qu'ils soient amphimixiques (mâles) ou gynogénétiques (femelles). Il serait donc impossible de corréler un type d'embryon à un nombre de chromosomes.

Dans un premier temps, j'ai réalisé des marquages au Hoechst sur des embryons issus de femelles gravides disséquées. Les femelles pondent les embryons au plus tard au stade 2 cellules. Nous nous attendions donc à pouvoir observer des embryons amphimixiques au stade de la rencontre des pronoyaux (paternel et

maternel) avec un état de condensation des chromosomes adéquat pour réaliser le dénombrement des chromosomes. Cette méthode n'a pas permis d'identifier de tels embryons, premièrement car le pourcentage de ces embryons est très faible et deuxièmement car il m'a été impossible de trouver des embryons au bon stade de condensation des chromosomes.

J'ai ensuite mis en place une stratégie qui aurait du permettre d'obtenir des embryons amphimixiques au bon stade. Pour cela, j'ai sélectionné les embryons afin de savoir s'ils étaient amphimixiques ou gynogénétiques, je les ai observés au microscope DIC sur coussin d'agarose entre lame et lamelle et les ai triés sur la base de la présence d'un ou de deux pronoyaux décondensés. Il fallait par la suite attendre la phase de condensation des chromosomes puis récupérer les embryons et leur faire subir plusieurs bains d'éthanol froid et de Hoechst avant de pouvoir les observer. J'ai rencontré de nombreuses difficultés techniques qui ne m'ont pas permis d'établir le caryotype de l'espèce *M. belari*.

Afin de trouver des embryons au stade une cellule, il est nécessaire de disséquer les femelles, filmer les embryons du stade post fécondation à la reformation des pronoyaux avant de savoir si l'embryon sera amphimixique ou non. Etant donné que très peu d'embryons sont amphimixiques, beaucoup de femelles ont dues être disséquées et beaucoup de temps a été passé avant de pouvoir isoler quelques embryons amphimixiques.

Les embryons une fois montés entre lame et lamelles sont difficiles à récupérer car ils peuvent coller à la lamelle ou au pad d'agarose.

Une fois récupérés, certains embryons n'ont pas été retrouvés dans les différents bains d'éthanol car ils ont tendance à y devenir transparents.

Il est possible de perdre les embryons pendant leur montage après le bain de Hoechst.

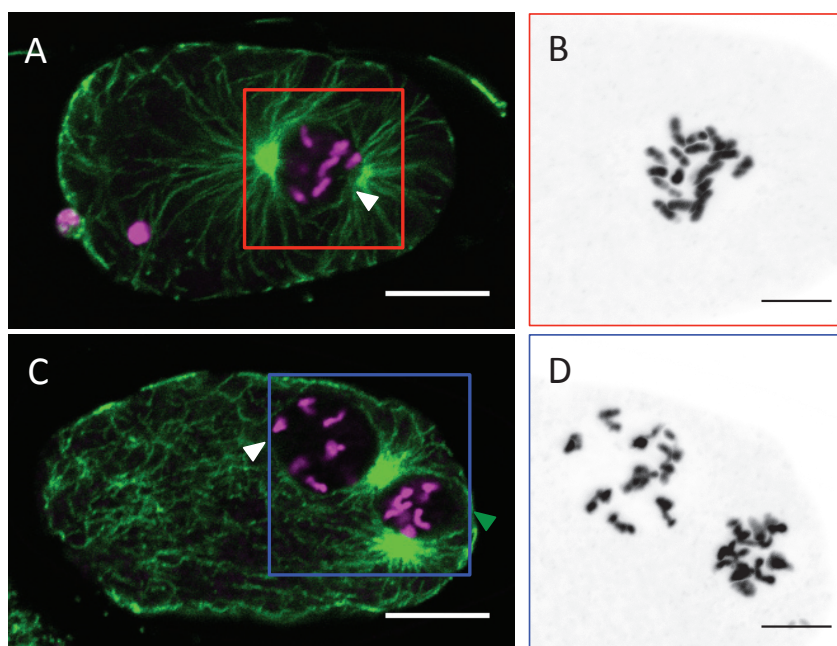
Une fois ce montage réalisé, l'embryon n'était pas toujours au bon stade de condensation des chromosomes pour pouvoir les compter.

Lorsque des embryons gynogénétiques ont été sélectionnés, bien que nous savions que nous devons compter 20 chromosomes, nous n'avons pas réussi à bien les distinguer les uns des autres. Après avoir réalisé plusieurs marquages d'embryons

gynogénétiques, nous avons réalisé un comptage du nombre de chromosomes en double aveugle et n'avons pas réussi à compter le même nombre de chromosomes pour le même échantillon.

Nous avons par ailleurs tenté d'écraser des cellules afin de pouvoir distinguer les chromosomes les uns des autres mais cette technique n'a pas fonctionné non plus.

Toutefois, si cette expérience n'a pas permis d'établir un caryotype, elle permet d'affirmer que le nombre de chromosomes entre les deux types d'embryons est assez similaire. Ceci indique bien que les deux types d'embryons sont diploïdes, la méiose incomplète produit donc un noyau diploïde, et chez les embryons amphimixiques, la diploïdie est maintenue grâce au mélange des ADN paternel et maternel (Figure 37). Ce résultat permet de confirmer que le système de déterminisme du sexe n'est pas un système haplo-diploïde connu chez certains insectes.



**Figure 37:** Les deux types d'embryons observés chez *M. belari* sont diploïdes. Marquage de l'ADN (magenta) et de la tubuline (vert) dans des embryons gynogénétique (A) et amphimixique (C). (B) et (D), zoom sur les parties encadrées dans (A) et (C), les chromosomes (en noir) sont observés en nombres similaires entre les deux types d'embryons. La flèche blanche indique le pronoyau femelle.

### 2.2.2 Recherche d'un lagging chromosome

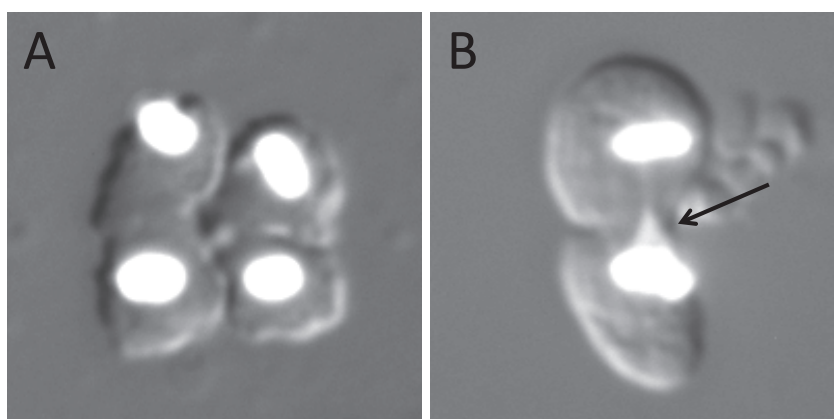
La présence d'un système XX/X0 impliquerait l'observation de lagging chromosome lors de la spermatogénèse durant les anaphases de méiose I ou II. Si les mâles ne possèdent qu'un chromosome X, celui-ci ne sera pas apparié à un homologue en métaphase. L'anaphase I permet la séparation des chromosomes homologues, si le chromosome X n'est pas apparié à son homologue, la ségrégation de ce chromosome sera donc retardée par rapport aux autres chromosomes. C'est le cas de la spermatogénèse chez les hermaphrodites de l'espèce *Auanema rhodensis* et les mâles de l'espèce *C. elegans*.

Il est aussi possible que durant l'anaphase I, les chromatides sœurs du chromosome X soient séparées, dans ce cas il n'est pas possible d'observer un lagging chromosome en anaphase I. En revanche en anaphase de méiose II, les autres chromosomes toujours à deux chromatides s'alignent et les chromatides sœurs sont séparées l'une de l'autre. Dans ce cas, le chromosome X n'aura plus qu'une seule chromatide, et il présentera un défaut de ségrégation au moment de l'anaphase II. C'est le cas de la spermatogénèse chez les mâles de l'espèce *Auanema rhodensis*.

Afin d'observer les différentes phases de méiose nous devons bien séparer les cellules les unes des autres en écrasant les tissus au montage sur la lame de microscopie. Cette technique entraîne la perte d'intégrité du tissu, il n'est donc plus possible de savoir à quelle phase de la méiose se trouve la cellule que l'on observe.

Grâce à un marquage de l'ADN au Hoechst, il a été possible d'observer des figures semblables à des lagging chromosomes dans quelques spermatides. Cependant, le fait d'avoir écrasé les gonades ne nous permet pas de savoir si les lagging chromosomes sont observés en anaphase I ou II. Très peu de figures d'anaphase sont observables chez *M. belari* contrairement à d'autres espèces de nématodes. De plus, les figures observées ne ressemblent pas à des figures de lagging chromosome observées chez d'autres espèces de nématodes. En effet, chez les autres espèces de nématodes, les lagging chromosome forment un point bien distinguable au milieu de la figure d'anaphase. Dans notre cas, nous observons une forme qui se distingue quelque peu du reste des chromosomes mais sans en être

détachée (Figure 38). Ce résultat indique qu'il existe peut-être un système XX/X0 chez les nématodes pseudogames du genre *Mesorhabditis*.



**Figure 38: Observation de spermatides en DIC et Hoechst.**  
L'ADN est marqué en blanc et les cellules en DIC. (A) spermatides secondaires. (B) spermatides primaires, la forme « lagging » est identifiée par une flèche.

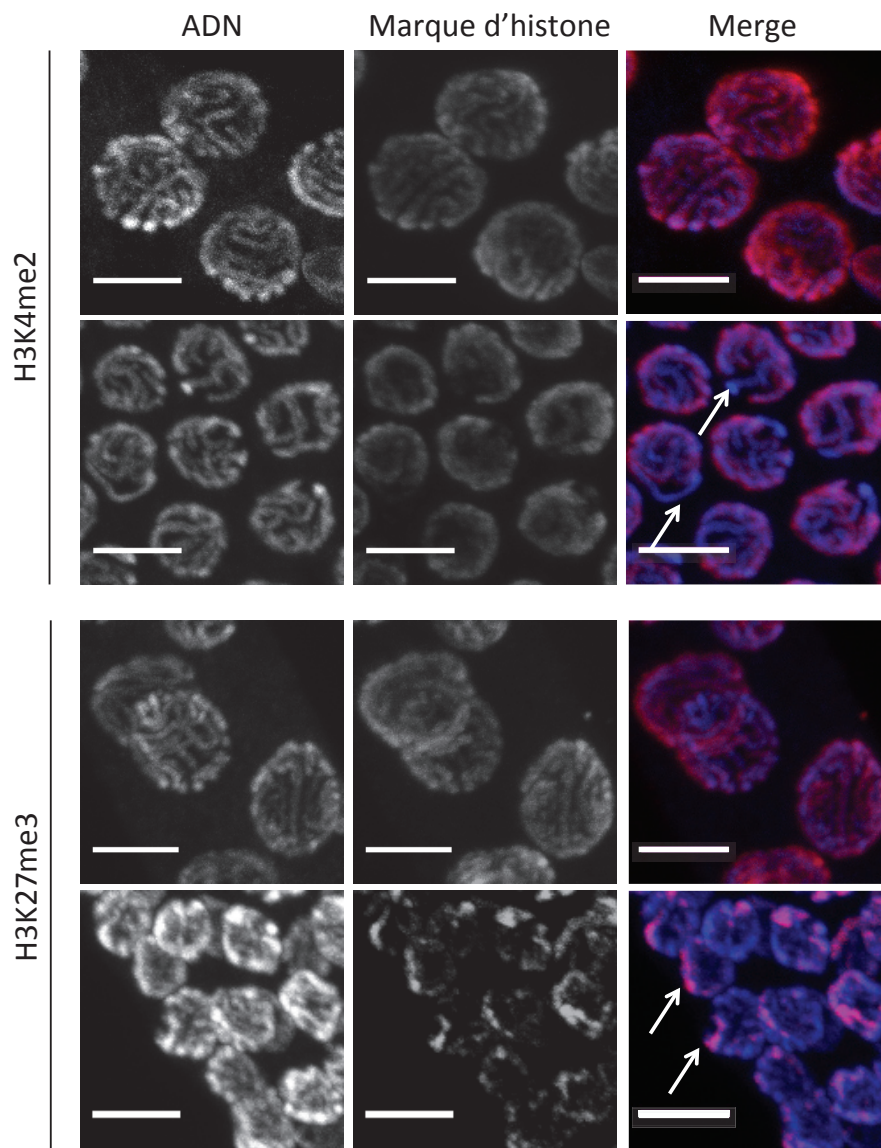
### 2.2.3 Recherche d'un chromosome X par marquage de modifications d'histone

Chez *C. elegans*, nous savons que le chromosome X est préférentiellement enrichi en marques épigénétiques répressives et dépourvu en marques activatrices (Kelly et al., 2002). Ce système permet le silencing du chromosome X pendant la méiose. Durant le stade pachytène les marques H3K4me2 et H3K9me3 sont donc absentes du chromosome X et enrichies sur les autres chromosomes. La marque H3K27me3 est quant à elle enrichie sur le chromosome X et absente des autres chromosomes. Afin de déterminer s'il existe un chromosome X chez *M. belari*, j'ai réalisé des marquages de modifications d'histones sur des gonades de femelles de la souche JU2817. Le marquage H3K4me2 ne devrait pas être présent sur un des chromosomes de *M. belari* en pachytène. Or, contrairement à *C. elegans*, où on peut bien distinguer la présence d'un fragment d'ADN non marqué, chez *M. belari*, tous les chromosomes présentent un enrichissement de cette marque (Figure 39).

Concernant le marquage contre H3K27me3, chez *C. elegans*, un fragment d'ADN apparaît bien plus marqué que les autres, mais chez *M. belari* aucun fragment n'est marqué préférentiellement (Figure 39). Ces résultats ne nous permettent pas

de conclure quant à l'absence de chromosome X chez *M. belari* car les 2 marques, l'une activatrice et l'autre répressive, sont toutes les deux présentes sur l'ensemble des chromosomes au stade pachytène.

Deux hypothèses permettraient d'expliquer ces résultats. La première selon laquelle il n'y aurait pas de chromosome sexuel chez l'espèce *M. belari*. La seconde selon laquelle il y aurait un chromosome sexuel mais qu'il serait régulé différemment de chez *C. elegans*.



**Figure 39: Modifications épigénétiques au stade pachytène.** Chez *C. elegans*, le chromosome X, indiqué par une flèche blanche, se distingue des autosomes de par le fait qu'il n'est pas décoré de la marque H3K4me2 et est le seul à être décoré de la marque H3K27me3. Chez *M. belari*, tous les chromosomes sont décorés par les deux marques épigénétiques.

## 2.2.4 Recherche de chromosomes sexuels par analyse bioinformatique

### 2.2.4.1 Comparaison du génome des mâles et des femelles de JU2817

Afin de déterminer s'il existe un chromosome sexuel chez cette espèce, nous avons réalisé le séquençage du génome de populations mâle et femelle séparément. L'objectif étant de comparer les génomes entre eux mais aussi par rapport au génome de référence afin de déterminer si certains fragments sont présents dans un seul sexe, ou dans les deux sexes mais avec des couvertures différentes. En effet, en fonction du système de déterminisme du sexe, nous devrions pouvoir observer des différences entre le génome des mâles et des femelles :

Si c'est un système XX/X0 alors nous ne devrions pas trouver de fragments spécifiques des mâles et certains fragments devraient avoir une couverture plus élevée chez les femelles que chez les mâles (correspondant au chromosome X)

Si le système est XX/XY, alors nous devrions trouver des fragments spécifiques des mâles (correspondant au chromosome Y) ainsi que certains fragments ayant plus de couverture chez les femelles que chez les mâles (correspondant au chromosome X).

De plus, une analyse des fréquences alléliques dans les deux sexes permettrait d'obtenir des informations quant à la présence d'un nombre différent du même chromosome entre les deux sexes.

En effet les allèles du chromosome X devraient être présents en deux copies chez les femelles et seulement une copie chez les mâles. Nous attendons donc une fréquence différente des allèles de ces chromosomes entre les mâles et les femelles par rapport aux autres chromosomes. Les femelles devront dans ce cas avoir une fréquence allélique 2 fois supérieure aux mâles dans cette espèce.

Nous devrions aussi attendre une plus forte homozygotie concernant les gènes du X chez les mâles par rapport au reste du génome. En effet, les mâles ne possédant qu'un seul chromosome X mais deux chromosomes pour les autosomes, les autosomes devraient présenter un plus fort taux d'hétérozygotie que le chromosome X.

Si le chromosome Y a récemment divergé par rapport au chromosome X, certaines parties de ce chromosome pourraient encore contenir des gènes présents sur le chromosome X mais ne plus recombiner avec celui-ci. Nous devrions nous attendre pour ces parties à trouver des SNP seulement présents chez les mâles.

L'analyse des génomes a été réalisée par Claire Burny et Laurent Modolo, ingénieurs de la plateforme « biocomputing » du LBMC. Pour mener cette analyse, ils ont comparé les couvertures des reads des génomes mâles et femelles à celle des reads du génome de référence (séquencé et assemblé à partir d'une population entière contenant peu de mâles).

Cette analyse a révélé la présence de gènes spécifiques des mâles (13 gènes) ou des femelles (21 gènes) (Tableau 4). De plus, l'analyse a aussi révélé la présence de gènes et de contigs ayant plus de couverture dans un sexe sans pour autant être absent de l'autre sexe. Ce résultat nous a paru surprenant au premier abord puisque nous n'attendions pas de reads spécifiques chez les femelles, ni de reads spécifiques aux deux sexes à la fois. Cependant, la couverture des reads spécifiques aux femelles est très faible alors que la couverture des reads spécifiques aux mâles est très élevée.

	Nombre	Comptages bruts		Comptages normalisés		Log2 Fold Change	
		Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Bruts	Normalisés
Contigs absents chez les femelles	31	0	117,1	0	157,3	-5,7	-6,1
Contigs absents chez les mâles	68	9,3	0	7,1	0	2,8	2,5
Gènes absents chez les femelles	13	0	159,1	0	221,6	-6,9	-7,5
Gènes absents chez les mâles	21	5,8	0	4,4	0	2,5	2,2

**Tableau 4: Résumé de l'analyse des contigs et des gènes absents chez l'un ou l'autre sexe. La moyenne des comptages pour chaque type de contigs ou de gènes a été calculée sur le nombre total de contigs et de gènes identifiés. Les comptages normalisés représentent la couverture normalisée pour chaque sexe par rapport à la couverture totale du génome dans les deux sexes. Le log2 Fold Change représente l'écart entre la couverture dans un sexe et la couverture dans un autre sexe. (un Log2 Fold Change de 1 indique qu'il y a deux fois plus de couverture pour un fragment chez les femelles)**

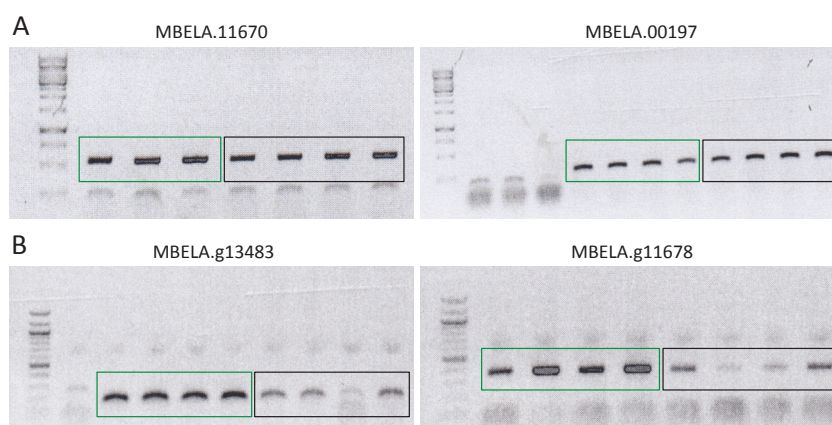


#### 2.2.4.2 Validation des résultats de séquençage par PCR

Afin de vérifier ces résultats j'ai réalisé des PCR sur ver unique sur plusieurs de ces contigs et de ces gènes, à la fois sur des mâles et des femelles. Si les séquences sont bien spécifiques d'un sexe, nous devrions observer leur amplification par PCR seulement chez les vers d'un sexe.

J'ai réalisé des PCR sur 15 contigs et 5 gènes uniquement séquencés chez les femelles, ces PCR ont révélé la présence des séquences à la fois chez les mâles et les femelles avec la même intensité. Nous pensons donc que le séquençage spécifique de ces séquences chez les femelles est un artefact du séquençage ou de son analyse, la présence d'aucun read chez les mâles et de peu de reads pour ces séquences chez les femelles est un argument en faveur de cette hypothèse (Figure 40A)

J'ai aussi réalisé des PCR sur 18 contigs et 10 gènes seulement séquencés chez les mâles. Toutes ces PCR montrent le même type de profil, il est possible d'amplifier ces séquences à la fois chez les mâles mais aussi chez les femelles. Cependant, l'amplification est beaucoup plus importante chez les mâles que chez les femelles (Figure 40B). Concernant ces séquences, nous avons émis l'hypothèse qu'elles pouvaient être présentes plusieurs fois dans le génome des mâles par rapport au génome des femelles. Ceci indiquerait qu'il y a eu une duplication spécifique de certaines séquences seulement dans le génome des mâles.



**Figure 40: PCR effectuées sur les contigs et les gènes avec une couverture différente entre les mâles et les femelles.**

Chaque PCR est effectuée sur un mâle (encadrés verts) ou une femelle (encadrés noirs) unique. (A) PCR effectuées sur deux contigs avec plus de couverture chez les femelles que chez les mâles. (B)

PCR effectuées sur deux gènes séquencés seulement chez les mâles. Les PCR sont représentatives des autres obtenues pour chaque catégorie de gènes et de contigs.

J'ai par ailleurs réalisé une recherche d'homologie au niveau protéique pour ces gènes contre les autres espèces de nématodes connues. Parmi ces gènes, cinq ne correspondent pas à des protéines connues, et deux correspondent à des protéines hypothétiques de nématodes dont la fonction est inconnue et sans domaine conservé. En revanche, trois d'entre eux correspondent à des protéines hypothétiques avec des domaines de liaison à l'ADN conservés, deux correspondent à des récepteurs transmembranaires (un à l'hormone de croissance GH et un à un neuropeptide) et une à une méthyltransférase avec un domaine SET conservé (Tableau 5). Parmi les gènes pour lesquelles aucune homologie n'a été trouvée, une recherche d'homologie contre tous les génomes de la base a permis de montrer que ces gènes n'appartenaient pas à de potentiels contaminants.

Gène	Blast	Domaine conservé
MBELA.g11678		
MBELA.g13063	Hyptothetical protein (nematodes)	
MBELA.g13483	Neuropeptide receptor	Transmembrane domain
MBELA.g15528	Hyptothetical protein (nematodes)	
MBELA.g15674	Hyptothetical protein (nematodes)	Helix-loop-helix DNA binding
MBELA.g15899	Hyptothetical protein (nematodes)	Helix-loop-helix DNA binding
MBELA.g17246		
MBELA.g17274	GH inducible TM protein	
MBELA.g17397	No match	
MBELA.g17460	SET domain protein (methyltransférase)	SET domain
MBELA.g20649	Hyptothetical protein (nematodes)	PDZ domain
MBELA.g21096		
MBELA.g21566		

**Tableau 5: Recherche d'homologie pour les gènes absents chez les femelles et présents chez les mâles. La recherche d'homologie a été réalisée au niveau protéique, la colonne blast représente les protéines de nématodes pour lesquelles la meilleure conservation à été trouvée. Les domaines conservés sont ceux indiqués par l'outil Blast**

#### 2.2.4.3 *Validation des résultats de PCR par qPCR*

Afin de vérifier l'amplification préférentielle de ces séquences chez les mâles, j'ai réalisé une qPCR sur 7 des 13 gènes séquencés uniquement chez les mâles. Pour

cela j'ai réalisé une qPCR par gène sur 4 mâles et 4 femelles uniques et ait choisi comme contrôle de charge le gène de la RNAP2.

Le résultat de ces qPCR montre que le gène de la RNAP2 est amplifié de la même manière chez les mâles et les femelles, indiquant que le même nombre de copies de ce gène se trouvent dans les deux génomes. De plus, chez les femelles, les gènes d'intérêt sont amplifiés de la même manière que celui de la RNAP2, ce qui indique qu'il existe le même nombre de copies des gènes d'intérêt chez les femelles que celui du gène de la RNAP2 chez les mâles et les femelles. En revanche, l'amplification des gènes d'intérêt chez les mâles est beaucoup plus importante que celle de la RNAP2 dans les deux sexes et des mêmes gènes d'intérêt chez les femelles. Une normalisation par individu par rapport au gène de la RNAP2 permet de montrer que l'amplification des gènes d'intérêt chez les mâles est 5 à 22 fois plus importante que chez les femelles (Figure 41). Ce résultat indique que les gènes spécifiquement amplifiés chez les mâles sont présents en plus grand nombre (5 à 22 fois plus) chez les mâles que chez les femelles. Il existe donc bien des duplications de certains gènes spécifiquement dans le génome des mâles. Ce résultat semble indiquer qu'il existe une transmission préférentielle de certains fragments d'ADN des pères à leurs fils. Toutefois, nous ne savons pas si ces duplications se trouvent dans différentes régions du génome, dans la même région du génome sur un chromosome non sexuel, ou bien sur un chromosome sexuel porté uniquement par les mâles. Cependant, ce résultat pourrait indiquer la présence d'un chromosome Y chez les mâles portant ces duplications.

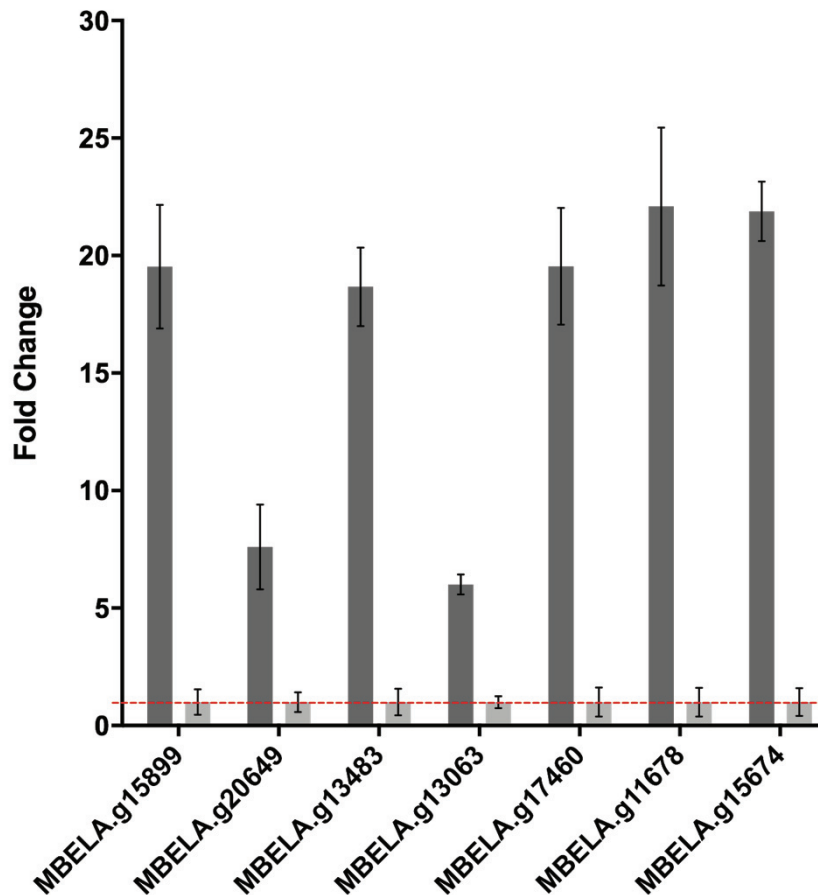


Figure 41: Les gènes présents uniquement chez les mâles sont aussi présents chez les femelles mais en plus faible quantité.

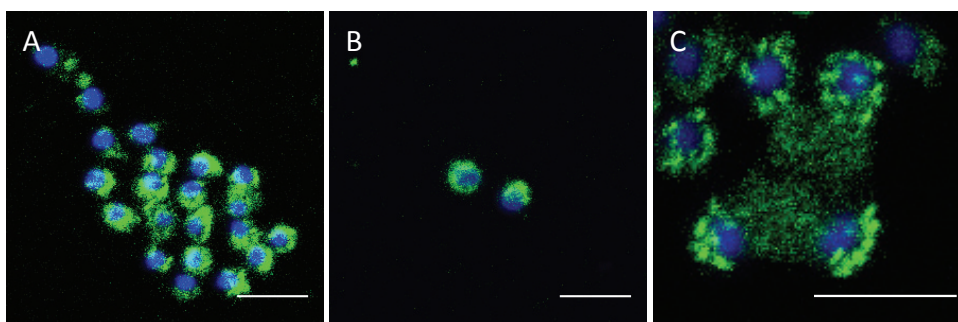
Le graphe représente pour chaque gène le Fold Change d'amplification par qPCR chez les mâles (gauche) et les femelles (droite). Chaque gène a été amplifié chez 4 individus différents (mâles et femelles) et l'amplification de ces gènes a été normalisée par rapport à l'amplification du gène de la RNAP2. Puis les amplifications des gènes chez les deux sexes ont été normalisées par l'amplification des gènes chez les femelles.

### 2.2.5 Recherche d'un meiotic drive

Dans le cas de *Mesorhabditis belari* la présence de chromosomes sexuels devrait impliquer un meiotic drive durant la spermatogénèse. En effet, les embryons amphimixiques ne donnent que des mâles, ceci signifie que l'ADN paternel doit toujours contenir le chromosome responsable du déterminisme mâle (dans le cadre d'un système XX/XY) ou ne doit pas contenir le chromosome X (dans le cas d'un système XX/X0). Chez plusieurs espèces au sex ratio biaisé il a été montré que la ségrégation des chromosomes sexuels était elle-même biaisée via un système de meiotic drive (Unckless et al., 2015).

Les protéines Major Sperm Protein (MSP) sont responsables de la motilité des spermatozoïdes chez les nématodes, ainsi que de la maturation des ovocytes. Chez l'espèce *Auanema rhodensis*, il a été observé que selon le contenu en ADN, les spermatides recevront ou non la protéine MSP pendant la spermatogénèse (Shakes et al., 2011). Les spermatozoïdes héritant du chromosome X héritent aussi des protéines MSP et sont capables de féconder les ovocytes. Les spermatozoïdes n'héritant pas du chromosome X ne sont alors pas capables de féconder les ovocytes, un tel mécanisme explique pourquoi un seul sexe est produit après la fécondation.

Afin de vérifier la présence d'un mécanisme similaire de ségrégation asymétrique de MSP pendant la spermatogénèse, j'ai réalisé un marquage contre les protéines MSP dans les gonades des mâles. L'anticorps utilisé pour ce marquage est un anticorps utilisé chez *Auanema rhodensis* et qui est capable de cross réagir chez l'espèce *M. belari*. J'ai ensuite compté le nombre de spermatozoïdes possédant les protéines MSP par rapport au nombre total de spermatozoïdes marqués grâce au Hoechst. Le marquage contre les protéines MSP chez *M. belari* a montré que tous les spermatozoïdes ont reçu ces protéines ( $n=908/908$ ) (Figure 42). Ce résultat indique qu'il ne semble pas y avoir une ségrégation biaisée de la protéine MSP et que, tous les spermatozoïdes, peu importe leur contenu en ADN, sont capables de féconder les ovocytes des femelles.



**Figure 42: Marquage du complexe de protéines MSP sur des gonades de mâles écrasées. (A) champ de spermatozoïdes (B) spermatozoïdes isolés (C) 4 spermatides à la fin de l'anaphase de méiose II organisée autour du corps résiduel. L'ADN est marqué en bleu et le complexe MSP en vert. La barre d'échelle représente 5µm.**

## 2.3 Conclusion et perspectives

### 2.3.1 L'analyse cytologique n'a pas permis de déterminer la présence d'un chromosome sexuel

L'analyse cytologique n'a pas permis de déterminer fermement la présence d'un chromosome sexuel.

Victor Nigon a décrit la présence d'une paire de chromosomes homologues dont la morphologie est différente de celle des autres bivalents lors de l'observation de la métaphase de méiose 1 chez les mâles. Cette observation pourrait indiquer qu'un bivalent XY serait présent, cependant, l'état de condensation de l'ADN durant la méiose ne nous a pas permis de distinguer les bivalents les uns des autres, ni donc de comparer leur morphologie. Nous ne comprenons pas bien comment V. Nigon a pu observer ces figures.

L'observation des cellules en anaphase n'a pas permis d'observer clairement un « lagging » chromosome, révélateur d'une potentielle hétérogamétie, ces observations doivent être réitérées à un moment plus précoce de l'anaphase afin de comprendre si les figures observées sont réellement des retards de ségrégation. Cependant, nous avons pu observer que le marquage MSP permet de déterminer à quel stade du développement méiotique sont observés les noyaux chez les mâles. En effet, MSP prend un aspect diffus en méiose 1 et plus fibreux en méiose II. Ce marquage pourrait donc nous permettre de sélectionner les cellules en méiose dans la totalité des cellules que l'on obtient après dissémination de tous les noyaux de la gonade.

La distribution de marques épigénétiques, a montré qu'au contraire de *C. elegans*, il n'existe pas de paysage épigénétique spécifique d'un chromosome dans la gonade des femelles *M. belari*, avec les marques H3K4me2 et H3K27me3. Les deux marques épigénétiques observées correspondent à une marque répressive et une marque activatrice, il est donc possible que chez *M. belari* le système de silencing du chromosome sexuel soit différent de celui retrouvé chez *C. elegans* ou que tous les chromosomes soient silencés ou non indépendamment de leur nature. Si un chromosome sexuel est présent chez cette espèce, il semble se comporter comme

les autosomes du point de vue de ces marques. Il a été décrit que chez les femelles gonochoriques *M. longespiculosa* DF5017, ces marques sont bien déposées de manière différente sur un chromosome par rapport aux autres (Kelly et al., 2002), il serait nécessaire de répéter ces résultats afin de comprendre si ce système a évolué rapidement entre les espèces gonochoriques et les espèces pseudogames de *Mesorhabditis*.

Toutefois, d'autres marques activatrices et répressives sont connues chez *C. elegans* et ont été observées préférentiellement déposées sur le chromosome X et sur les autosomes (Samson et al., 2014). Nous pourrions donc marquer les noyaux en pachytène avec des anticorps dirigés contre ces autres marques afin de déterminer s'il existe bien un chromosome chez *M. belari* qui possède un paysage épigénétique particulier durant la méiose. Il sera nécessaire également de reproduire ces expériences à partir de la gonade des mâles. Car s'il existe un chromosome Y chez les mâles il pourrait être décoré des marques H3K9, connues pour être déposées au niveau des régions répétées et donc du Y (Du et al., 2015).

De plus, à cause de la difficulté à observer des chromosomes isolés, nous n'avons pas pu déterminer le nombre de chromosomes présents dans les deux types d'embryons et donc savoir si les femelles ont 20 chromosomes dont 2 X et les mâles 19 chromosomes et un seul X. Cependant, les marquages des chromosomes dans les embryons précoces nous a permis d'écarter la possibilité d'un déterminisme haplo-diploïde étant donné qu'environ le même nombre de chromosomes est présent dans les deux types d'embryons. Afin de déterminer précisément le nombre de chromosomes présents dans les deux types d'embryons, nous pourrions marquer spécifiquement les télomères des chromosomes. Ce type de technique est disponible chez *C. elegans* et permettrait de marquer chaque chromosome distinctement. En connaissant le nombre de télomères présents par cellule nous pourrions alors connaître le nombre de chromosomes présents et déterminer si les mâles et les femelles possèdent le même nombre de chromosomes ou pas.

### 2.3.2 L'analyse bioinformatique révèle la présence de marqueurs génétiques spécifiques des mâles

Le séquençage Illumina couplé au séquençage MINION a permis d'augmenter la résolution de l'assemblage du génome de *M. belari*, passant de plus de 20000 contigs avec l'Illumina seulement à moins de 2000 contigs en réalisant l'assemblage hybride entre les données obtenues avec les deux techniques (Ce travail a été effectué par une étudiante de l'équipe). Grâce à cet assemblage, nous avons pu observer la répartition des gènes présents en plus grande quantité chez les mâles. Lorsque les gènes sont mappés sur cet assemblage, on retrouve plusieurs contigs différents possédant ces séquences. Les différentes séquences d'un même gène ne semblent pas comporter de nombreuses différences, mais le paysage entourant ces séquences est très différent. Il est donc probable que ces gènes soient plus amplifiés chez les mâles de par le fait qu'ils soient présents en une seule copie chez les femelles et plusieurs copies chez les mâles. Lors du séquençage, les gènes ont été annotés comme uniques et pourtant retrouvés à plusieurs endroits dans le génome, ceci est dû au fait que les séquences des gènes ne présentent pas beaucoup de différences entre elles et ont été regroupées comme un seul gène avant les étapes d'analyse du génome.

Lors du mapping des séquences d'Illumina spécifiques d'un sexe sur ces contigs, on observe notamment que les séquences de ces gènes ne sont pas présentes sur plusieurs contigs chez les femelles mais sur un seul. Ceci semble indiquer que les mâles et les femelles possèdent certains gènes retrouvés en plusieurs copies seulement chez les mâles. De plus, plusieurs de ces gènes sont retrouvés dans les mêmes régions au sein de certains contigs. Ceci pourrait indiquer la présence de régions spécifiquement présentes chez les mâles, et donc potentiellement celle d'un chromosome Y.

De nombreuses duplications de gènes présents sur le chromosome X ont notamment été découvertes sur le chromosome Y de l'espèce *Tokudaia muenninki*, certaines séquences pouvant être dupliquées jusqu'à 66 fois (Murata et al., 2016). Chez les mâles *M. belari*, l'analyse des séquences de ces gènes devrait révéler une variation plus importante des fréquences alléliques que chez les femelles. Chez les femelles, on devrait observer les fréquences alléliques correspondant à un seul gène, alors que chez les mâles on devrait observer les différents allèles d'un même gène présent plusieurs fois dans le génome. Les différents gènes évoluant séparément les



uns des autres, on devrait alors observer plus de différences entre eux que lors de l'analyse des fréquence alléliques des femelles.

L'analyse par PCR a été réalisée sur des gènes décrits comme absents chez les femelles par l'analyse bioinformatique. Cependant, d'autres gènes ont été trouvés plus présents chez les mâles que chez les femelles sans en être complètement absents. L'analyse de ces gènes paraît nécessaire pour connaître le plus grand nombre de régions dupliquées dans le génome des mâles afin potentiellement de réaliser un assemblage spécifique des contigs ne comprenant que ces régions. De cette manière, nous pourrions améliorer l'assemblage d'un potentiel chromosome Y.

Afin de déterminer la présence d'un chromosome sexuel, il serait intéressant d'effectuer des expériences de FISH pour déterminer si ces duplications sont présentes sur un seul chromosome présent seulement chez les mâles.

### 2.3.3 *M. belari* ne semble pas posséder de séquences spécifiques des femelles

Certains gènes ont été séquencés chez les femelles et non chez les mâles, cependant, nous n'avons pas validé ce résultat par PCR. Ce résultat semble indiquer que les femelles ne possèdent pas de séquences spécifiques, ces séquences pourraient être localisées sur le chromosome X qui serait présent en une seule copie dans le génome mâle par rapport aux autosomes et potentiellement séquencées avec moins de couverture que le reste du génome. Dans ce cas, les gènes et les contigs séquencés avec une plus grande couverture chez les femelles que chez les mâles devraient comprendre les séquences présentes en double copie chez les femelles et une seule chez les mâles si les femelles portent deux chromosomes X et les mâles un seul. L'absence de validation de ces séquences permet aussi d'écarter la possibilité d'un système ZZ/ZW.

### 2.3.4 La transmission d'un chromosome spécifique des mâles chez *M. belari* impliquerait un meiotic drive

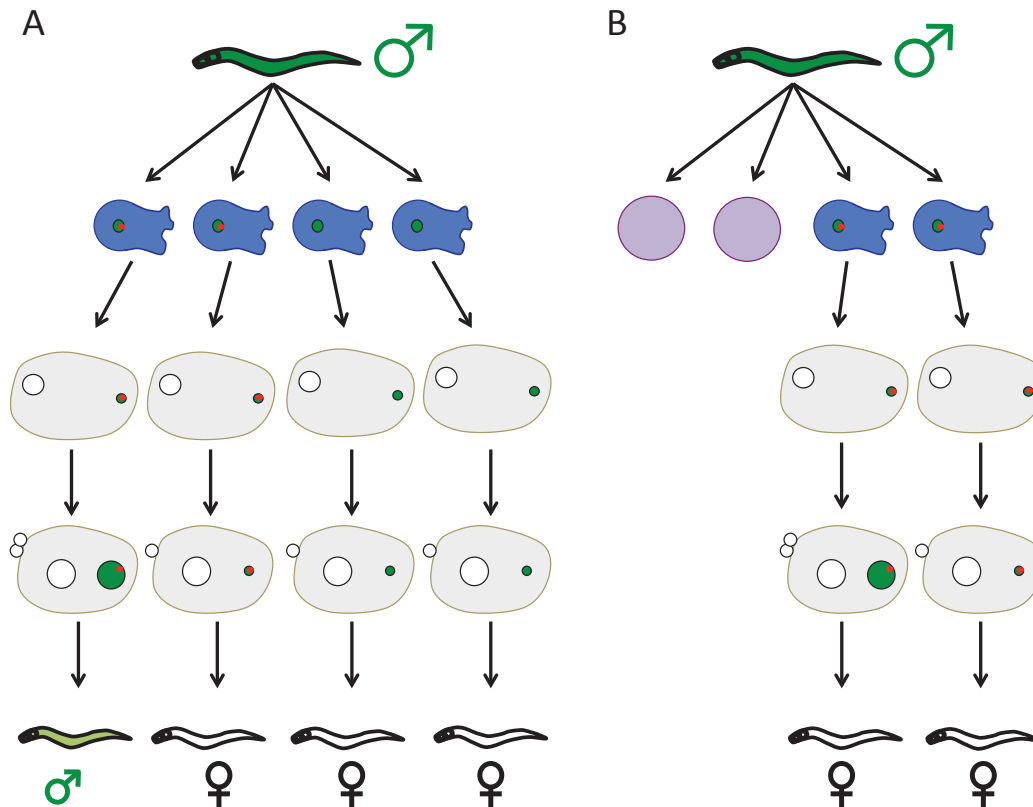
La décondensation de l'ADN paternel entraîne le développement systématique du zygote en mâle. Si les mâles sont hétérogamétiques XY et les femelles homogamétiques, l'ADN paternel et donc les spermatozoïdes doivent contenir le chromosome Y dans chaque embryon amphimixique afin de produire un mâle. Les mâles possédant un chromosome X et un chromosome Y devraient donc posséder un système leur permettant de ségréger le chromosome Y dans tous les spermatozoïdes viables.

L'analyse du marquage MSP semble montrer que tous les spermatozoïdes contiennent le facteur nécessaire à leur motilité, indiquant qu'un système de meiotic drive basé sur la séquestration de la protéine MSP dans le spermatozoïde contenant le chromosome Y n'est pas mis en place au contraire de l'espèce *Auanema rhodensis* (Shakes et al., 2011). D'autres facteurs tels que des protéines nécessaires à l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte sont nécessaires à la fertilité des spermatozoïdes, il est donc probable qu'un autre de ces facteurs ne soit pas séquestré dans les spermatozoïdes ne comportant pas le chromosome Y. Ainsi, seuls les spermatozoïdes portant le chromosome Y seraient tout de même capables de féconder les ovocytes. Nous pourrions aussi vérifier que tous les spermatozoïdes restent viables avant la fécondation afin de comprendre si des spermatozoïdes portant un chromosome X sont produits mais meurent avant la fécondation.

Une autre possibilité concernant le développement de tous les embryons amphimixiques en mâle serait que l'ovocyte subit un développement embryonnaire en fonction du génotype de l'ADN paternel. Dans ce cas, l'ADN paternel contenant le chromosome X ne serait jamais décondensé, et l'ADN paternel contenant le chromosome Y ne serait décondensé que dans certains ovocytes.

Grâce au séquençage de l'ADN contenu dans les spermatozoïdes, il serait possible de comprendre si tous les spermatozoïdes matures contiennent le chromosome Y ou bien si le chromosome X et Y sont équitablement retrouvés dans ces cellules. Par la suite, un marquage par DNA FISH nous permettrait de déterminer si tous les pronoyaux mâles qui se décondensent contiennent ce chromosome Y. Dans un cas, soit seul le chromosome Y est retrouvé dans les spermatozoïdes matures et donc tous les pronoyaux paternels le contiennent, qu'ils se décondensent

ou non. Soit les spermatozoïdes peuvent contenir le chromosome X ou le chromosome Y et dans ce cas, aucun des pronoyaux contenant le chromosome X ne devrait se décondenser, et les pronoyaux contenant le chromosome Y pourraient ou non se décondenser.



**Figure 43:** Schéma explicatif des types de ségrégation possibles du facteur paternel chez *M. belari*. Les deux schémas représentent le cas d'un déterminisme XX/XY. (A) un mâle peut produire à partir d'une cellule mère, 4 spermatozoïdes dont deux seulement recevraient le chromosome X et deux le chromosome Y (en rouge). Les pronoyaux paternels contenant le chromosome X ne se décondenseront pas et deviendront des femelles. Seuls quelques pronoyaux contenant le chromosome Y se décondenseront. Dans ce cas l'embryon donnera un mâle. Si le pronoyau ne se décondense pas alors qu'il contient le chromosome Y, alors l'ovocyte deviendra une femelle. (B) Seuls les spermatozoïdes recevant le chromosome Y sont viables, le residual body contiendra alors le chromosome X. Seuls quelques pronoyaux contenant le chromosome Y seront décondensés et donneront des mâles tandis que l'absence de décondensation entraînera la production d'une femelle.

En plus des systèmes XX/XY et XX/X0 connus chez les nématodes, de nombreux autres types de déterminisme chromosomique existent chez d'autres espèces.

Par exemple, l'existence d'un système comportant les chromosomes X, Y et W chez *Xenopus tropicalis* a été mise en évidence (Schartl, 2015). Les mâles peuvent être YZ, YW, ZZ et les femelles ZW ou WW. Chez *Microtus oregoni*, les femelles sont X0 et

les mâles XY (Veyrunes et al., 2010). Les mâles produisent par un système de mitotic drive des spermatozoïdes Y ou O. De nombreux autres systèmes existent, comportant plusieurs chromosomes sexuels comme les 5 paires de chromosomes sexuels présents chez *Ornithohynchus anatinus* (Wallis et al., 2008).

La découverte de tels systèmes est complexe à mettre en place d'un point de vue biologique, de plus le séquençage et l'assemblage des chromosomes sexuels est complexe de par la présence de nombreuses séquences répétées. Cependant, l'amélioration de l'assemblage du génome de *M. belari* devrait permettre d'identifier la présence d'un ou plusieurs chromosomes différents entre les mâles et les femelles. En parallèle, la technique de DNA FISH permettra de valider ces résultats.

### 3. Le déroulement de la méiose femelle dans les deux catégories d'embryons

Chez les individus sexués, la méiose produit des gamètes haploïdes, et la diploïdie de l'organisme est restaurée grâce au mélange des ADN des deux parents. Chez *M. belari* nous savons que les mâles et les femelles sont diploïdes. Cependant les mâles proviennent d'embryons où les ADN paternel et maternel se sont mélangés après la méiose alors que les femelles proviennent d'embryons où l'ADN paternel n'est pas utilisé après son entrée dans l'ovocyte.

Afin que tous les individus soient diploïdes, il faut donc qu'un système de maintien de la diploïdie, autre que le mélange des ADN paternel et maternel existe.

Plusieurs systèmes permettant de maintenir la diploïdie chez les individus asexués sont connus, nous avons donc cherché sur la base de ce qui a été décrit, quel système existe chez *M. belari*.

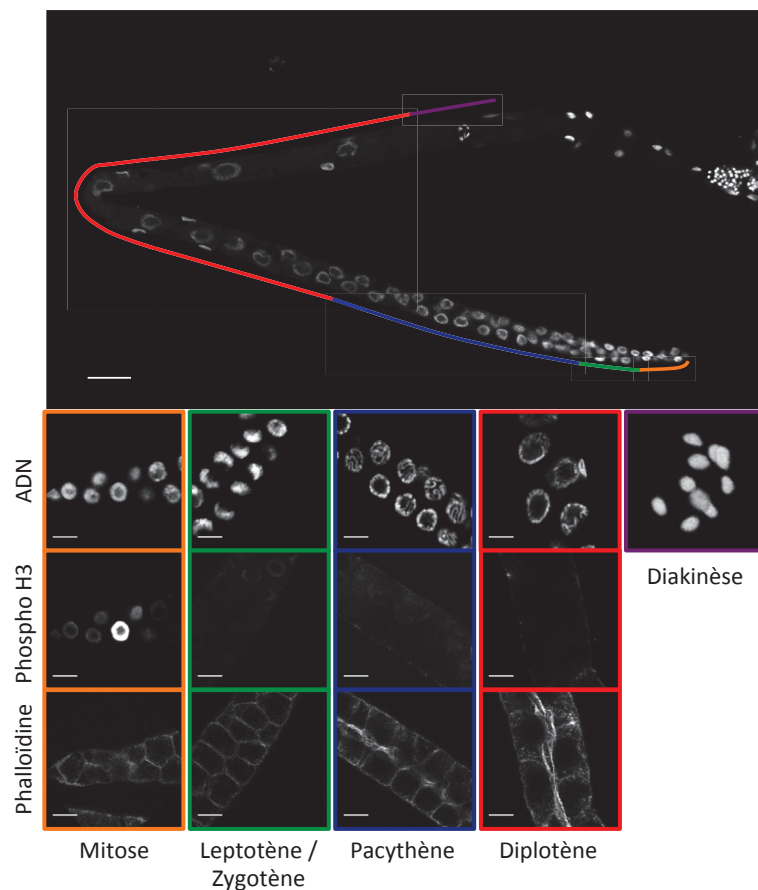
#### 3.1 Analyse cytologique de la gonade des femelles de *M. belari*

Nous avons tout d'abord réalisé une analyse cytologique des gonades des femelles de la souche JU2817 grâce à un marquage à la phalloïdine et au Hoechst. La gonade des nématodes est organisée dans le temps, les noyaux sont en prolifération dans la partie distale, puis plus ils se rapprochent de l'utérus, plus ils avancent dans le cycle méiotique. Avant le passage dans la spermathèque pour être fécondés, les ovocytes sont arrêtés en prométaphase de méiose I. L'entrée du spermatozoïde déclenchera la fin de la méiose femelle et le début du développement embryonnaire.

Chez *M. belari*, nous avons retrouvé la même organisation de la gonade, avec quelques différences par rapport à *C. elegans* (Figure 44). Contrairement à *C. elegans*, la gonade des femelles n'est pas syncytiale. Chez *C. elegans*, les noyaux sont baignés dans le même cytoplasme avant d'être séparés par une membrane les uns des autres au stade diakinèse. Chez *M. belari*, tous les noyaux sont séparés les uns des autres dès le début de la gonade au stade de la mitose. De plus, contrairement à *C. elegans*, peu de noyaux sont observés en même temps au stade diplotène et un

seul ovocyte mature (au stade diakinèse) est présent avant la spermathèque. Un marquage phosphoH3 a permis de mettre en évidence que chez *M. belari*, contrairement à *C. elegans*, peu de noyaux sont en mitose au même moment.

Etant donné qu'un seul ovocyte mature à la fois se trouve dans la gonade de *M. belari* nous avons cherché à comparer cet ovocyte chez de nombreuses femelles. Pour cela, nous avons réalisé des dissections de gonades de femelles et les avons marqués au Hoechst. Si certains noyaux présentent des différences, nous pourrions comprendre une partie des mécanismes à l'origine des différences de méiose entre les deux types d'embryons.



**Figure 44: Organisation de la gonade femelle de *M. belari*.**  
 (Haut) Gonade entière marquée au Hoechst, les différentes étapes de la méiose sont représentées par les différentes couleurs. (Bas) Observation des noyaux subissant les différentes étapes de la méiose.

### 3.1.1 Il n'existe pas de différence entre les ovocytes avant la fécondation

L'analyse des gonades de la souche JU2817 n'a révélé aucune différence visible entre les différents ovocytes matures observés.

Tous les ovocytes avant la fécondation présentent 10 points marqués au Hoechst (n=111/111 ovocytes observés), sachant que chez *M. belari* il y a n=10 chromosomes et que les femelles sont diploïdes, ceci signifie qu'avant l'entrée du spermatozoïde, tous les chromosomes homologues sont appariés en bivalents (Figure 45).

Aucun élément ne permet de dire qu'avant la fécondation, des différences existent entre les deux types d'embryons, les noyaux femelles semblent tous subir le même type de modifications. Les deux types de méiose diffèreraient donc l'un de l'autre après la fécondation.

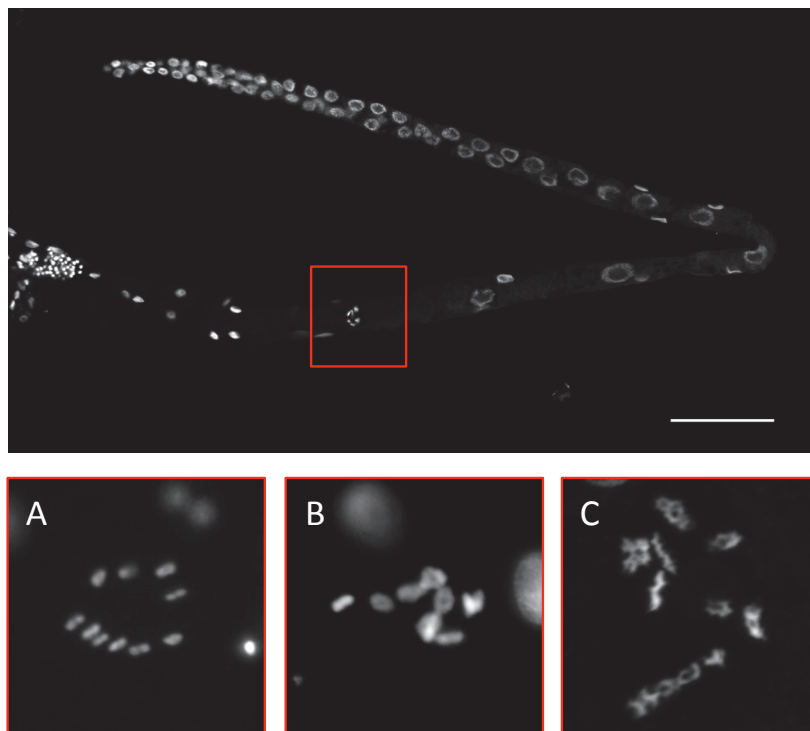


Figure 45: Marquage de l'ADN dans des gonades de femelles de la souche JU2817. (Haut) gonade complète (bas) observations possibles de l'état de l'ADN dans l'ovocyte n-1 (juste avant le passage dans la spermathèque et la fécondation) encadré en rouge sur la gonade entière. Les chromosomes homologues sont appariés, ils sont soit condensés (A), ou encore au stade de crossing over. Dans ce cas, les chromosomes adoptent une forme en croix (B) ou bien en chiasmata (C).

### 3.1.2 Observations de figures de crossing-over

Avant la fécondation, il est possible d'observer des figures chromosomiques semblables à des croix. Ces figures sont typiques d'événements de crossing-over chez les nématodes. Par ailleurs, nous avons pu observer des figures semblables à des chiasmas, qui à notre connaissance, n'avaient pas été décrits chez les nématodes mais sont aussi typiques des événements de crossing-over chez d'autres organismes. Il semblerait donc que la mise en place des crossing-over soit maintenue chez cette espèce.

### **3.2 Analyse des différents embryons après la fécondation**

#### **3.2.1 Les embryons ne présentent pas tous la même organisation des chromosomes sur la plaque métaphasique**

Par la suite, j'ai réalisé des marquages au Hoechst sur des embryons au stade 1 cellule. Ce marquage permet d'observer les chromosomes maternels en méiose, l'état de condensation de l'ADN paternel ainsi que le nombre de globules polaires présents. Le nombre de globules polaires nous renseigne directement sur l'avancée de la méiose. A chaque division méiotique, un globule polaire est exclu de l'embryon:

-Si aucun globule polaire n'est observé alors la première division de méiose n'a pas encore eu lieu

-Si un globule polaire est observé alors la première division de méiose a eu lieu mais la deuxième n'a pas encore eu lieu

-Si deux globules polaires sont observés alors les deux divisions de méiose ont eu lieu et l'ADN maternel ne subira plus de réduction. Ce cas n'apparaît que pour les embryons amphimixiques, dans ce cas on observe deux pronoyaux (mâle et femelle) décondensés.

Tant que la méiose n'est pas terminée, l'ADN paternel ne se décondensera pas. En réalisant des marquages de l'ADN lors de la méiose, nous ne pouvons donc pas savoir quel sera le devenir des embryons (gynogénétiques ou amphimixiques).



Nous proposons donc de corrélérer le nombre d'observations effectuées au nombre d'embryons amphimixiques et gynogénétiques dans la population.

De plus il est difficile de distinguer l'ADN paternel d'un globule polaire car ils adoptent la même forme en un point condensé marqué au Hoechst. Pour mener ces observations, je me suis donc basée sur le nombre de pronoyau, et le nombre de points d'ADN observables.

- Un seul point condensé correspond à un embryon pour lequel l'ADN paternel n'est pas décondensé et où il n'y a pas encore eu de division méiotique.

- Deux points condensés et un pronoyau décondensé correspondent à des embryons où une seule division de méiose a eu lieu. Les deux points condensés correspondent à l'ADN paternel et au premier globule polaire.

- Deux points condensés et deux pronoyaux décondensés correspondent à un embryon amphimixique pour lequel les deux divisions de méiose ont eu lieu et les deux pronoyaux (maternel et paternel) sont décondensés.

Les marquages ont permis d'identifier tout d'abord deux types d'organisation des chromosomes sur la plaque métaphasique (Figure 46).

Un premier avec 10 points distincts organisés en cercle ( $n=48/60$ ). Cette organisation peut correspondre à 10 chromosomes homologues appariés en métaphase de méiose I ou à 10 chromosomes à deux chromatides en métaphase de méiose II. Ces observations ont été faites par Victor Nigon et peuvent aussi être faites chez *C. elegans* où les chromosomes homologues et les chromatides sœurs apparaissent appariés sur la plaque lors des deux divisions de méiose.

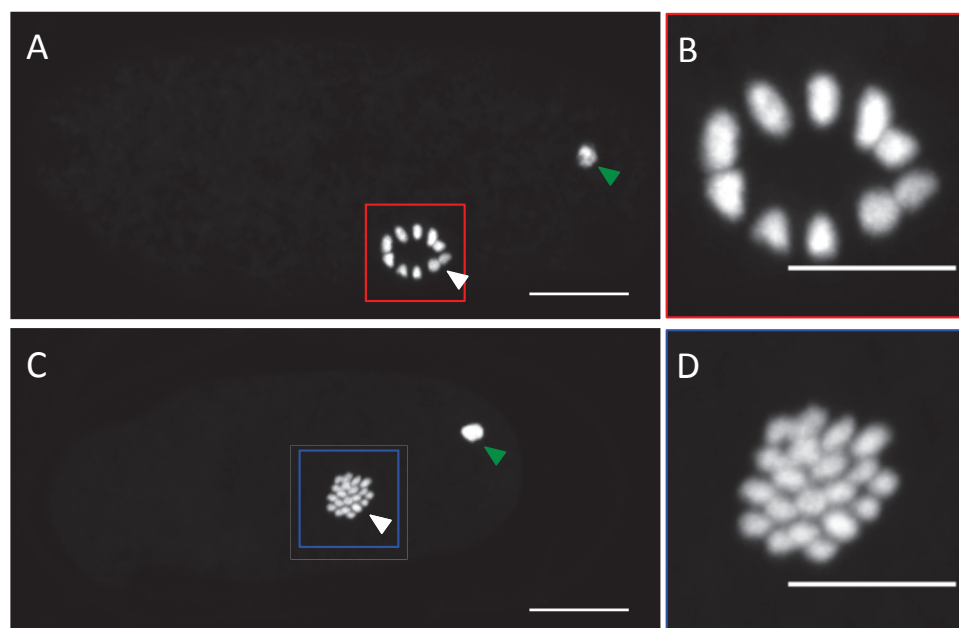
Le deuxième type d'organisation correspond à l'observation de 20 points distincts organisés en forme de rond ( $n=12/60$ ). Cette organisation pourrait correspondre à deux types de méiose incomplète :

- Un premier cas où la division réductionnelle n'aurait pas lieu, dans ce cas les 20 points pourraient correspondre aux 20 chromosomes non appariés en métaphase de méiose I. Dans ce cas la méiose serait de type apomixique.

- Un deuxième cas où seulement la division réductionnelle aurait lieu. Les chromosomes homologues seraient séparés pendant cette division, mais pas les chromatides sœurs lors de la deuxième division. Dans ce cas les 20 points

correspondraient aux 2 chromatides de chacun des 10 chromosomes, séparées les unes des autres sans être ségréguées. Dans ce cas la méiose serait de type « Second Division Restitution ».

Dans ces 2 cas de méiose incomplètes, après une division méiotique, tous les chromosomes ne présenteraient qu'une chromatide, plus de division méiotique ne pourrait survenir et donc le contenu en ADN du pronoyau femelle restera diploïde.



**Figure 46: Observation du nombre de chromosomes présents sur la plaque métaphasique en métaphase de méiose 1.**

Le pronoyau maternel est indiquée par une flèche blanche et le pronoyau paternel par une flèche verte. Aucun globule polaire n'est observé, indiquant que la première division de méiose n'a pas encore eu lieu. (A) Observation de 10 points correspondant à 10 paires de chromosomes homologues (bivalents), (C) observation de 20 chromosomes homologues non appariés. (B et D) zoom sur les encadrés de (A et C). La barre d'échelle représente 10 $\mu$ m.

Il est important de noter que les figures correspondant à 20 points ne sont observées que dans 25% des cas. On ne peut donc pas considérer que ces figures correspondent à la cause de la méiose incomplète puisque plus de 90% des embryons produisent des femelles et subissent donc une méiose incomplète. On ne peut pas non plus considérer qu'elles correspondent à des figures de la méiose complète puisque moins de 10% des embryons subissent une méiose complète et deviennent des mâles.

Ces figures pourraient donc correspondre à des événements plus tardifs de la méiose incomplète. Il faudrait alors considérer que la figure à 10 points correspond à la figure observable dans les deux types d'embryons. A partir de cette figure plusieurs scénarios pourraient survenir aboutissant soit à une méiose complète soit à une méiose incomplète et donc à l'observation de figures à 20 points.

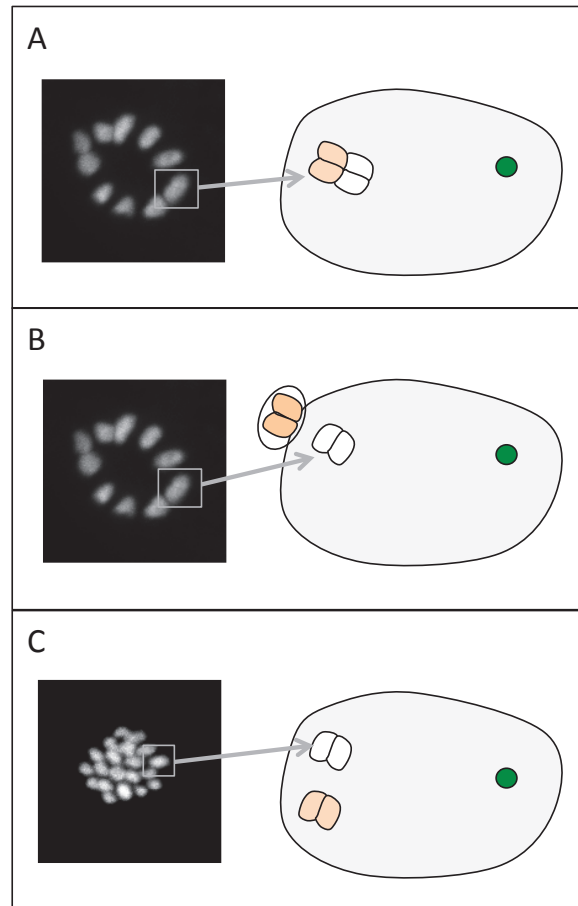
### 3.2.2 Une seule division de méiose semble se produire chez les embryons gynogénétiques

Afin de déterminer à quel moment de la division nous nous trouvons, nous avons observé le nombre de globules polaires présents en regard des figures de méiose. Sur 99 embryons observés, 78 présentaient des figures de méiose à 10 points et 21 des figures de méiose à 20 points. Sur les 78 embryons présentant des figures de méiose à 10 points, 70 n'avaient pas de globule polaire et 8 en avaient 1. Sur les 21 embryons présentant des figures de méiose à 20 points, aucun ne présentait de globule polaire.

Ce résultat signifie que les figures de méiose à 10 points correspondent à la fois à des figures de méiose observables en méiose I (pas encore de globule polaire) et en méiose II (un globule polaire issu de la première division de méiose). Quand 10 points sont observables en méiose I c'est donc que les 10 chromosomes homologues sont appariés et alignés sur la plaque. Quand 10 points sont observables en métaphase de méiose II, ceci veut dire que 10 chromosomes à deux chromatides sont alignés sur la plaque. Concernant la figure de méiose à 20 points, si à chaque fois qu'elle est observée il n'y a pas encore de globule polaire ceci signifie que les 20 points correspondent à 20 chromosomes homologues qui ne se seraient pas appariés (Figure 47).

Encore une fois, le pourcentage d'embryons avec des figures de méiose à 20 points ne correspond pas au pourcentage d'embryons devant subir une méiose incomplète, une hypothèse possible est que les chromosomes homologues appariés en métaphase de méiose I pourraient se détacher avant d'être ségrégés. Tous les chromosomes s'aligneraient ainsi sur la plaque métaphasique. Ceci expliquerait aussi pourquoi si peu de métaphase de méiose II à 10 points sont observables. Elles ne

représenteraient que la fraction d'embryons amphimixiques subissant une méiose complète et donc une séparation des chromosomes homologues (10 points observables sur la plaque) et une séparation des chromatides sœurs par la suite (10 points observables sur la plaque et un globule polaire).



**Figure 47: Schéma explicatif des figures de méiose observées chez *M. belari*.** Les ovocytes contiennent l'ADN paternel en vert et les chromosomes maternels subissant la méiose en blanc et beige (un seul couple de chromosomes homologues est représenté et correspond à l'encadré gris sur les images de microscopie, 2 chromatides sœurs blanches et 2 chromatides sœurs beiges composent les chromosomes de ce couple). Le globule polaire est représenté par les chromosomes exclus de l'ovocyte. Les figures de méiose à 10 points peuvent correspondre à (A) 10 paires de bivalents alignés sur la plaque métaphasique quand aucun globule polaire n'est observé et (B) 10 chromosomes à deux chromatides quand un globulaire polaire est observé. (C) Les figures de méiose à 20 points correspondent à 20 chromosomes à deux chromatides alignés sur la plaque, aucun globule polaire n'est encore observé.

Tous les ovocytes auraient donc des chromosomes homologues appariés avant la fécondation. Ensuite, selon le type d'embryon, l'appariement des chromosomes homologues serait maintenu ou non lors de la méiose I.

Dans les embryons amphimixiques, les chromosomes homologues resteraient appariés après la fécondation, chaque paire de chromosomes serait séparée pendant la méiose. La moitié des chromosomes serait ségréguée dans le globule polaire tandis que les 10 chromosomes restants s'aligneraient de nouveau sur la plaque. Lors de la méiose II, les chromatides sœurs de chaque chromosome seraient ensuite séparés, la moitié de ces chromatides serait ségréguée dans le deuxième globule polaire et le pronoyau résultant serait haploïde.

Dans les embryons gynogénétiques, les chromosomes homologues se détacheraient après la fécondation avant de tous s'aligner sur la plaque métaphasique. La méiose I n'aurait donc pas lieu et seule la division de méiose II, équivalente à une mitose se produirait. Séparant ainsi les chromatides sœurs des 20 chromosomes, le pronoyau résultant serait diploïde (Figure 48).

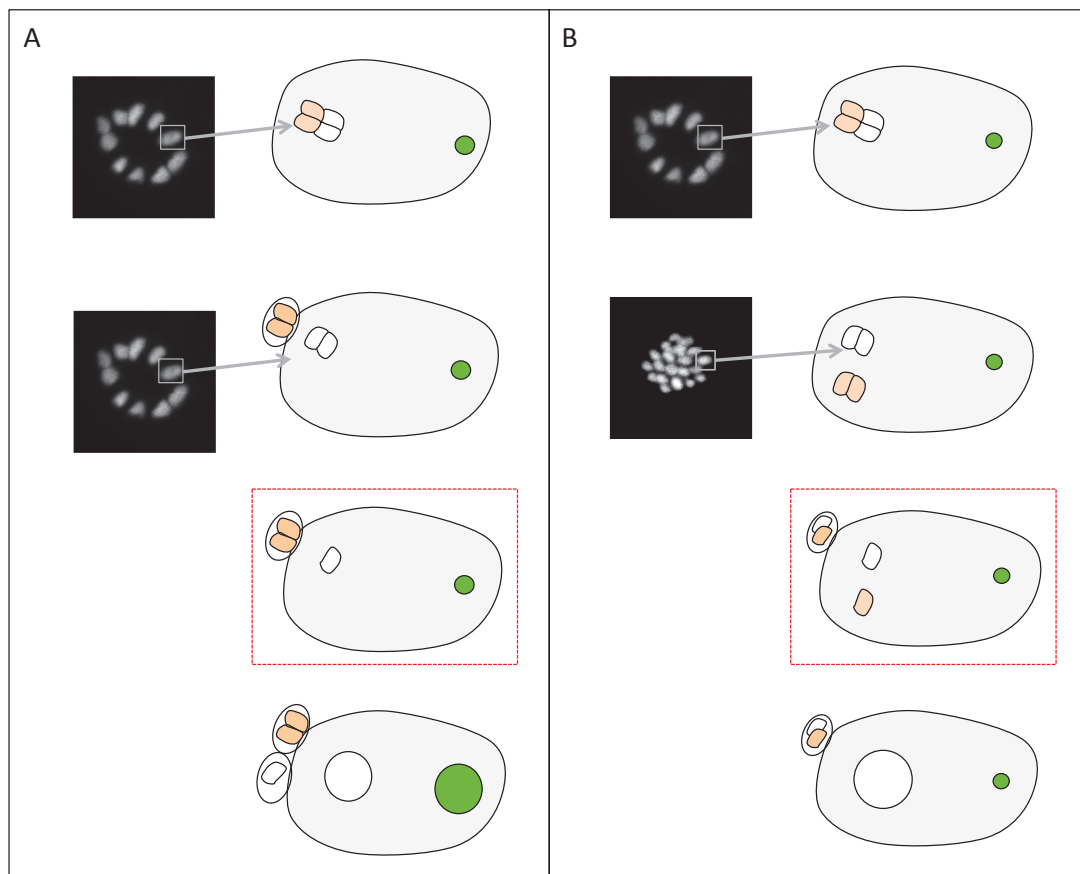


Figure 48: Schéma explicatif du type de division méiotique dans les embryons amphimixiques et gynogénétiques.

(A) embryon amphimixique pour lequel les chromosomes homologues sont appariés avant la fécondation, la première division de méiose entraîne l'exclusion de la moitié des chromosomes (globule polaire « beige »), les 10 chromosomes à deux chromatides restants sont alignés sur la

plaque pour la deuxième division de méiose qui entraîne l'exclusion de la moitié des chromatides sœurs (globule polaire « blanc »). Le pronoyau femelle est haploïde et l'ADN paternel se décondense. (B) embryon gynogénétique pour lequel les chromosomes homologues sont appariés avant la fécondation, 10 points sont visibles sur la plaque métaphasique. Après la fécondation les chromosomes des 10 bivalents sont séparés et s'alignent tous sur la plaque. 20 chromosomes à deux chromatides sont alignés sur la plaque pour l'unique division de méiose qui entraîne l'exclusion de la moitié des chromatides sœurs (globule polaire « blanc » et « beige »). Le pronoyau femelle est diploïde et l'ADN paternel ne se décondense pas. Les ovocytes encadrés en rouge ne possèdent plus que des chromosomes à 1 chromatide, qui ne peuvent alors plus subir de division méiotique.

### 3.2.3 Plusieurs observations préliminaires permettent d'étayer l'hypothèse selon laquelle seule la méiose équationnelle se produirait dans les embryons gynogénétiques

Des marquages de la phosphorylation de l'histone H3 ont permis de montrer que lors de son entrée dans l'ovocyte, l'ADN paternel porte cette modification. Dans les embryons présentant une figure de méiose à 10 bivalents appariés, la modification est maintenue durant la méiose I et disparaît lorsqu'un premier globule polaire est émis. Ce résultat semble indiquer que la phosphorylation de l'histone H3 est maintenue sur l'ADN paternel jusqu'à la fin de la méiose I. Cependant chez les embryons présentant une figure de méiose à 20 chromosomes non appariés, la marque disparaît avant l'émission du globule polaire, pouvant indiquer que la cellule se trouve déjà dans une phase plus tardive de la méiose, soit la méiose II.

L'analyse par mapping de Kmers sur le génome a permis de montrer que le taux d'hétérozygotie du génome de *M. belari* était élevé par rapport à d'autres espèces de nématodes asexuées connues. Une des manières de maintenir l'hétérozygotie serait en effet de ne pas effectuer de méiose I mais seulement une méiose II, ainsi les deux allèles de chaque gène sont conservés dans le pronoyau.

Des résultats préliminaires montrent le maintien de l'hétérozygotie sur plusieurs sites dans le génome. Plusieurs sites hétérozygotes ont été choisis au hasard dans le génome, des femelles hétérozygotes pour ces loci ont été croisées puis ont pondu jusqu'à la fin de leur cycle reproductif. La ségrégation de ces sites chez leurs filles a montré que la plupart des sites étaient toujours hétérozygotes après la méiose. L'absence de méiose I dans les embryons amphimixiques expliquerait donc le maintien aussi important de l'hétérozygotie chez des femelles se reproduisant asexuellement d'un point de vue génomique.

L'analyse de la ségrégation d'un site hétérozygote chez la souche JU2856 a permis de montrer un maintien de l'hétérozygotie chez les descendantes femelles. Dans le gène de la RNAP2, la souche JU2856 possède un site hétérozygote. L'analyse de la descendance de plusieurs femelles hétérozygotes pour ce site a révélé que sur 135 F1, 124 possédaient toujours un site hétérozygote quand 11 possédaient un site homozygote. Une analyse de 30 femelles 6 mois plus tard a révélé que ce site était toujours hétérozygote chez la plupart des femelles. Il est possible dans ce cas que l'hétérozygotie soit due à l'absence de méiose I et que l'homozygotie apparaisse s'il y a eu recombinaison avant la séparation des chromosomes homologues (Figure 49).

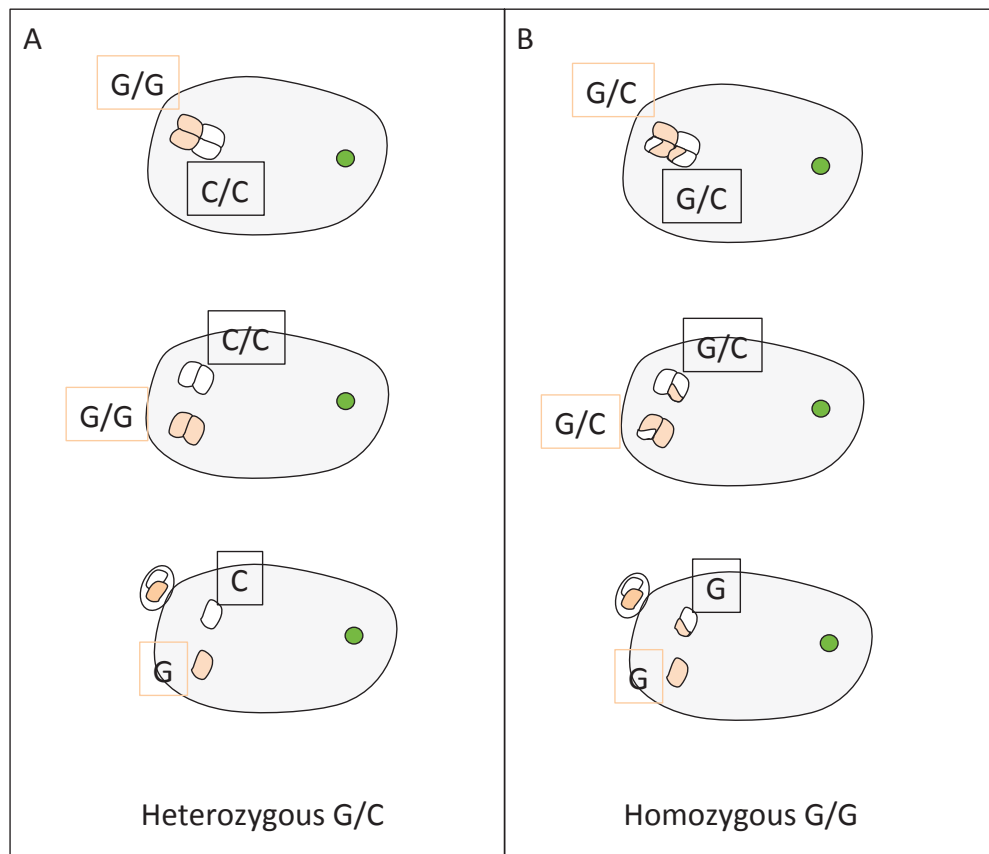


Figure 49: Explication de la répartition des sites hétérozygotes dans la descendance femelle de la souche JU2865.

Les ovocytes contiennent l'ADN paternel en vert et une paire de chromosomes homologues en blanc et beige et portent un SNP différent. Avant la fécondation les chromosomes homologues sont appariés (A) sans crossing over (B) avec crossing over. Après la fécondation, les chromosomes de chaque bivalent se séparent et s'alignent sur la plaque métaphasique. (A) L'absence de crossing-over n'entraîne pas d'échange entre chromosomes homologues au niveau du SNP, la division de méiose entraîne la séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome et le maintien de l'hétérozygotie maternelle dans l'ovocyte. (B) Les crossing-over entraînent l'échange de matériel entre les chromosomes homologues, chaque chromosome homologue possède une chromatide portant un SNP différent. La division de méiose entraîne la séparation des chromatides sœurs de

chaque chromosome entraînant la perte d'hétérozygotie maternelle pour le zygote. Selon l'agencement des chromosomes sur la plaque, cette division peut aussi entraîner le maintien de l'hétérozygotie. Dans ce cas, les deux chromatides réarrangés doivent se trouver du côté des chromatides non exclues de l'ovocyte.



### 3.3 Conclusions et perspectives

#### 3.3.1 Les embryons gynogénétiques semblent subir une méiose 2 unique

Victor Nigon avait émis l'hypothèse que deux types de méiose pouvaient se produire dans les embryons gynogénétiques. Un premier type où seule la première division de méiose se produit, laissant des chromosomes à deux chromatides dans l'ovocyte qui se sépareraient sans que la moitié d'entre elles soit ségréguées dans un globule polaire. Un deuxième type où seule la méiose 2 se produirait, permettant la séparation des chromatides de tous les chromosomes sans ségrégation préalable des chromosomes homologues. Nos observations tendent à montrer que seul le deuxième type de méiose proposé par Victor Nigon se produirait.

Premièrement, lorsque 20 chromosomes alignés sur la plaque sont observés, aucun globule polaire n'est encore observé, montrant que ces ovocytes n'ont pas encore subi de division méiotique. Il apparaîtrait donc que ces chromosomes sont les chromosomes homologues non appariés, alignés sur la plaque métaphasique et non 20 chromatides sœurs résultant de la séparation des chromatides sœurs de 10 chromosomes homologues après une division de méiose 1.

Deuxièmement, le nombre de figures de méiose avec 10 bivalents appariés sur la plaque est beaucoup plus important que le nombre d'ovocytes amphimixiques. Certains de ces ovocytes deviendront donc des embryons gynogénétiques, cependant, peu d'entre eux ont été observés avec 10 chromosomes alignés et un globule polaire, indiquant qu'un grand nombre d'entre eux n'ont pas encore subi de méiose lorsque 10 bivalents sont appariés sur la plaque. De plus, il a été montré chez *Daphnia pulex* que les bivalents peuvent s'apparier au début de la méiose, entamer la première division de méiose jusqu'en anaphase puis ne pas être ségrégués et être tous de nouveau alignés sur la plaque pour subir une division équationnelle (Hiruta et al., 2010).

Troisièmement, l'observation d'un fort taux d'hétérozygotie dans le génome soutient l'hypothèse d'une méiose équationnelle où l'hétérozygotie peut être partiellement maintenue.

Quatrièmement, l'analyse de la répartition des allèles d'une femelle hétérozygote dans sa descendance femelle montre le maintien, la plupart du temps, de l'hétérozygotie. Dans le cas d'une méiose 2 unique, la théorie prédit que 70% à 80% de l'hétérozygotie sera maintenue dans la descendance en cas de crossing-over, alors que seulement 30 à 40% de celle-ci sera maintenue dans une méiose 1 unique avec crossing-over. Le taux de maintien de l'hétérozygotie pour le locus RNAP2 chez les femelles JU2856 soutient donc préférentiellement l'hypothèse de la ségrégation des chromosomes selon une méiose 2 unique où des événements de recombinaison se seraient produits.

Grâce au séquençage du génome, nous avons pu réaliser un anticorps-antipeptide contre la séquence putative de la protéine HTP-1. La protéine HTP-1 est située entre les chromatides sœurs seulement lors de la première et au début de la deuxième division de méiose. L'observation de cette protéine aurait donc pu nous renseigner sur la nature des chromosomes observés, à savoir s'ils représentent des bivalents, ou des chromosomes à deux chromatides sœurs séparés les uns des autres ou bien des chromosomes à une chromatide. Cependant, cet anticorps n'a pas fonctionné. Il serait donc intéressant de développer des anticorps contre d'autres types de protéines localisées seulement au niveau des chromatides sœurs comme la protéine LAB-1 par exemple.

De plus, la possibilité d'utiliser un marqueur vital de l'ADN permettrait de suivre directement en « live imaging » les événements de ségrégation que les chromosomes subissent dans les deux types d'embryons. Des molécules telles que la SiR-DNA ou le Hoechst vital permettent de marquer l'ADN de cellules vivantes qui peuvent continuer à se comporter comme dans un cycle cellulaire normal. Ces molécules permettent d'imager les embryons de nématodes après la fécondation et la mise au point concernant l'espèce *M. belari* est actuellement effectuée dans l'équipe.

### 3.3.2 La recombinaison homologue semble se produire chez *M. belari*

Les phénotypes connus entraînant la séparation précoce des chromosomes homologues chez *C. elegans* sont dus à l'absence de certaines protéines de pairing, de cohésines ou de la protéine SPO-11. Cependant, l'absence d'appariement se produit dans les ovocytes avant la fécondation, et non après la fécondation seulement.

La présence de bivalents appariés dans les ovocytes avant fécondation semble indiquer que les mécanismes de pairing et de synapse sont correctement mis en place dans les deux types de méiose. De plus, des chiasmas sont visibles et des chromosomes en croix sont observés, indiquant que le processus de recombinaison et de crossing-over semble être aussi présent. La séparation précoce des chromosomes homologues pourrait donc être due à la régulation de ces jonctions après la fécondation. Dans un embryon gynogénétique, on pourrait alors penser que le clivage des protéines présentes entre les chromosomes homologues se produit avant la mise en place du fuseau mitotique, ou bien que ce clivage a lieu une fois le fuseau mis en place. Dans ce cas l'anaphase pourrait être abortive, par exemple à cause d'un faible attachement des microtubules aux chromosomes, entraînant l'arrêt de la méiose réductionnelle et la reprise d'une méiose équationnelle sans division préalable.

Afin de déterminer que les événements de recombinaison ont bien lieu, il serait intéressant de regarder la localisation des protéines COSA-1 ou RAD-51 par immunofluorescence. D'ores et déjà nous avons pu constater que des femelles hétérozygotes pour le SNP de RNAP2 produisaient une majorité de femelles hétérozygotes mais aussi quelques homozygotes, suggérant fortement que la recombinaison est possible. Il faudrait confirmer cette hypothèse avec deux loci séparés physiquement sur un même chromosome. L'assemblage hybride entre les données de séquençage Illumina et MINION a permis d'obtenir des fragments assemblés allant jusqu'à la taille de 2Mb. L'analyse de la répartition d'allèles hétérozygotes séparés physiquement sur ces grands contigs pourrait nous permettre de comprendre si des événements d'échanges entre chromosomes ont eu lieu.

### 3.3.3 Comment produire deux catégories d'embryons ?

Dans certaines espèces asexuées, les protéines de la recombinaison ont disparu du génome, permettant d'expliquer l'observation de méiose alternatives. Cependant, *M. belari* produit deux types d'ovocyte dont l'un subit une méiose canonique. Il semblerait donc improbable que les gènes des protéines nécessaires à ce type de méiose ne soient pas présents dans son génome. La différence entre les deux types d'embryons pourrait alors être due à une différence d'expression d'une protéine nécessaire au processus de méiose, ou bien à la dégradation spécifique de celle-ci dans le type d'embryon gynogénétique. En effet, chez *Daphnia pulex*, on retrouve tous les gènes de méiose conservés. Pourtant cette espèce est capable de réaliser un type de méiose apomictique lorsqu'elle se reproduit par parthénogénèse. Cette conservation est alors nécessaire pour les organismes pratiquant la reproduction sexuée même de manière sporadique. Chez *M. belari*, l'absence de certains de ces gènes ne permet donc pas de conclure sur le type de méiose réalisé dans les embryons gynogénétiques.

Le devenir de l'embryon pouvant être dicté par le contenu de l'ovocyte, nous essayons de réaliser le séquençage transcriptomique des deux types d'embryons, cela pourrait permettre de comprendre quels types de facteurs sont impliqués dans le déroulement des différents types méiotiques. Un marquage par RNA FISH pourrait alors permettre de montrer la présence spécifique de ces facteurs dans l'un ou l'autre des ovocytes, en plus de potentiellement révéler une localisation spécifique dans la cellule qui pourrait nous renseigner sur leur rôle.

## 4. Comment est contrôlé le devenir de l'ADN paternel ?

En fonction du type d'embryon, nous savons que l'ADN paternel restera condensé ou se décondensera. La dynamique de décondensation de l'ADN paternel est encore mal comprise chez les différents organismes étudiés. Cependant, nous savons que l'ADN paternel est compacté grâce à des protamines dans les spermatozoïdes. Les protamines remplacent les histones et permettent un taux de compaction beaucoup plus important. Chez *C. elegans*, plusieurs protéines ont été identifiées comme de potentielles protamines, ce sont les protéines SPCH-1/-2/-3 et -4. Après son entrée dans l'embryon, les protamines seront remplacées de l'ADN paternel par des histones maternelles. Nous savons aussi que certaines histones spécifiques perdurent sur l'ADN paternel pendant sa compaction. Elles sont retrouvées seulement sur l'ADN paternel après la fécondation, c'est le cas de l'histone HTAS-1. De plus, nous savons que l'histone HTZ-1 est préférentiellement enrichie sur l'ADN paternel après son entrée dans l'embryon.

### 4.1 Tentatives de marquages de protéines impliquées dans la condensation ou la décondensation de l'ADN paternel

En ciblant ces différentes protéines par des marquages dans des embryons amphimixiques et gynogénétiques nous pourrions avoir un aperçu de la dynamique du renouvellement des histones et des protamines paternelles par les histones maternelles. L'analyse comparée de cette dynamique dans les deux types d'embryons nous permettrait alors de comprendre si une de ces étapes ne se produit pas dans les embryons gynogénétiques, contrairement aux embryons amphimixiques, expliquant pourquoi l'ADN paternel ne se décondense pas dans les embryons gynogénétiques.

Par homologie avec les génomes de plusieurs nématodes, nous avons trouvé le gène de la protéine HTZ-1. Nous avons donc réalisé un anticorps anti-peptide contre deux peptides de cette protéine. Le sérum contenant les deux anti-peptides nous a permis de cibler spécifiquement les spermatozoïdes et l'ADN paternel dans

les embryons de *M. belari*, sans cibler l'ADN des autres noyaux chez les mâles et les femelles. Ce résultat confirme que cette protéine est préférentiellement enrichie sur l'ADN paternel chez cette espèce. Après purification de ces protéines nous n'avons pas pu réaliser un marquage des spermatozoïdes. De nouveaux marquages avec le sérum contenant les deux anti-peptides nous permettront donc de comprendre la dynamique de renouvellement de cette histone après l'entrée dans l'embryon et de savoir si cette étape se produit chez les embryons amphimixiques et non dans les embryons gynogénétiques.

De plus j'ai testé des anticorps contre les protéines HTAS-1, HTZ-1 et SPCH-1 fonctionnant chez *C. elegans* mais ces anticorps ne permettent pas de marquer l'ADN paternel chez *M. belari*.

#### **4.2 Analyse de la formation du pronoyau mâle après la fécondation**

La protéine Mab414 est une protéine de pore nucléaire permettant de marquer la membrane nucléaire. Durant la décondensation de l'ADN paternel, la membrane nucléaire du pronoyau se forme. Un marquage anti-Mab414 nous permettrait donc de comprendre si, dans les embryons gynogénétiques, la formation de cette membrane se produit ou non. Ceci pourrait nous permettre de comprendre si cette étape est compromise dans ce type d'embryon. Si cette étape ne se produit pas, alors nous pourrions conclure qu'une étape antérieure à la formation de la membrane nucléaire empêche la décondensation de l'ADN paternel dans les embryons gynogénétiques. Le marquage anti-Mab414 fonctionne chez *M. belari*, des résultats préliminaires montrent qu'il est possible de voir la membrane nucléaire du pronoyau paternel dans des embryons amphimixiques, cependant ce marquage n'est pas visible chez des embryons gynogénétiques (Figure 50). Nous avons pu réaliser un faible nombre de marquages seulement, cette analyse nécessite donc de plus amples investigations.

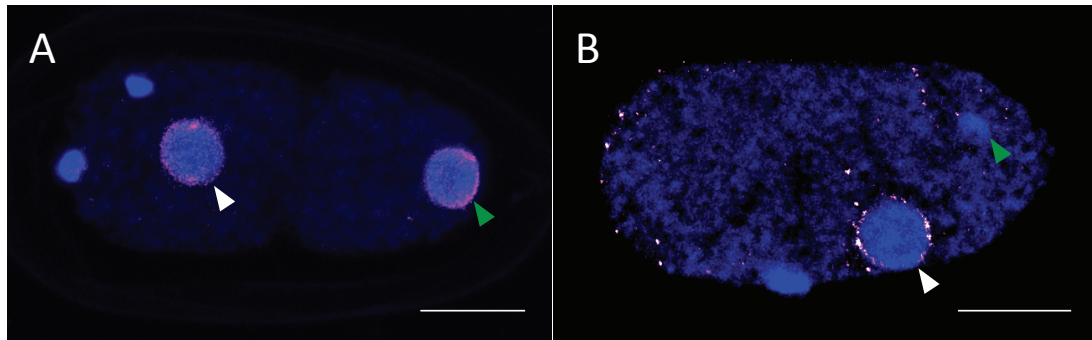


Figure 50: Marquage de Mab414 dans les deux types d'embryons de *M. belari*. L'ADN en bleu et Mab414 en rouge. Le pronoyau femelle est indiqué par une flèche blanche et le pronoyau mâle une flèche verte. Les structures marquées en bleu mais non indiquées sont les globules polaires (A) embryon amphimixique dont les deux pronoyaux sont décondensés et entourés d'un marquage Mab414 (B) Embryon gynogénétique dont seul le pronoyau femelle est décondensé et entouré d'un marquage Mab414.

Dans les deux types d'embryons, nous avons pu constater que les centrioles sont bien apportés par le spermatozoïde. Dans les embryons amphimixiques, les centrosomes sont ancrés à la membrane nucléaire du pronoyau paternel alors que dans les embryons gynogénétiques, ils ne restent pas localisés autour de l'ADN paternel condensé (Figure 51).

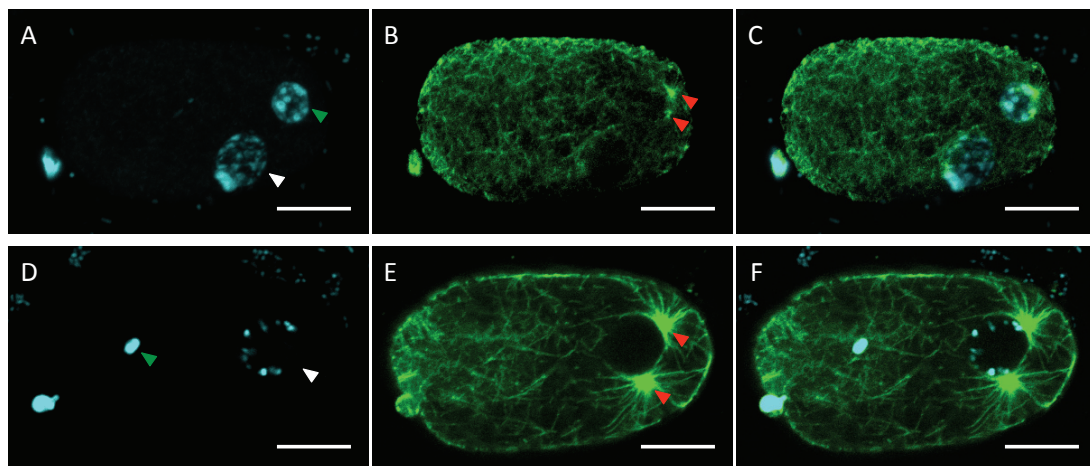


Figure 51: Marquage de l'ADN et de la tubuline dans les deux types d'embryons de *M. belari*. Le pronoyau femelle est indiqué par une flèche blanche et le pronoyau mâle par une flèche verte, les centrosomes sont indiqués par une flèche rouge. Les autres structures marquées en bleu mais non indiquées sont les globules polaires. (A, D) Hoechst; (B, E) Tubuline; (C, F) merge. Panel haut : embryon amphimixique, les deux centrosomes sont ancrés à la membrane du pronoyau paternel; panel bas : embryon gynogénétique. Les centrosomes sont ancrés à la membrane du pronoyau femelle.

### 4.3 Conclusions et perspectives

L'absence de décondensation dans les embryons gynogénétiques semble être accompagnée d'une absence de formation de l'enveloppe nucléaire puisque la protéine Mab414 n'est pas retrouvée autour du pronoyau mâle non décondensé. Cependant, il n'est pas possible de savoir si l'absence d'organisation de cette enveloppe est une cause ou une conséquence de l'absence de décondensation de l'ADN paternel.

Chez *M. belari*, aucune des protéines responsables de la condensation de l'ADN paternel n'est connue. Une analyse transcriptomique et protéomique des gonades de mâles permettrait de déterminer quels types de protéines sont responsables de la conformation condensée de l'ADN paternel. La compréhension des acteurs de cette décondensation pourrait par la suite permettre de déterminer si l'absence de décondensation est due à la présence ou à l'absence de certains facteurs sur l'ADN paternel ou dans les spermatozoïdes avant la fécondation, ou bien si tous les spermatozoïdes possèdent un ADN conformé de la même manière. Dans ce cas, l'analyse de l'ADN paternel après la fécondation nous renseignerait sur les étapes nécessaires à la décondensation de l'ADN paternel.

Afin de comprendre quelle étape est inhibée et empêche la décondensation de l'ADN paternel dans les ovocytes amphimixiques, nous pourrions alors étudier la présence ou l'absence des mécanismes responsables de sa décondensation. Nous pourrions déterminer s'il existe bien des protamines formant des ponts disulfides afin d'analyser s'ils sont bien éliminés lors de l'entrée de l'ADN paternel dans l'ovocyte. Ensuite nous pourrions regarder si ces protamines sont éliminées de l'ADN paternel ou non grâce à des immunomarquages. Par ailleurs, nous pourrions observer si les deux types d'embryons possèdent des histones maternelles ainsi que des protéines chaperonnes chargées de remplacer les protamines par ces histones.

Il serait par ailleurs intéressant de réaliser une recherche d'homologie avec des protéines telles que les chaperonnes d'histones connues chez les autres organismes ainsi que les protéines responsables de l'élimination des ponts disulfides. Nous pourrions réaliser ainsi, sans analyse transcriptomique préalable des gonades,



des immunomarquages ou du RNA FISH pour distinguer la localisation et l'expression de ces acteurs dans les deux types d'ovocytes.

Chez de nombreux nématodes, l'entrée du spermatozoïde permet de déclencher la polarisation de l'embryon grâce à la déstabilisation du réseau d'actomyosine effectuée par les centrioles paternels. Afin de déterminer si ce rôle est aussi porté par les centrioles chez *M. belari*, nous pourrions réaliser des marquages de l'actomyosine dans les embryons et déterminer si le réseau est déstabilisé au niveau des centrioles. Pour déterminer que ce rôle n'est adopté que par les centrioles, nous pourrions produire des spermatozoïdes anuclées et vérifier si la polarisation des embryons est correcte.

Les embryons gynogénétiques ne semblent pas utiliser l'ADN paternel pour se développer. Des spermatozoïdes anuclées pourraient aussi nous permettre de comprendre si la nécessité de la fécondation pour ces embryons repose seulement sur l'entrée du spermatozoïde pour déclencher le développement et l'apport des centrioles pour la première mitose.

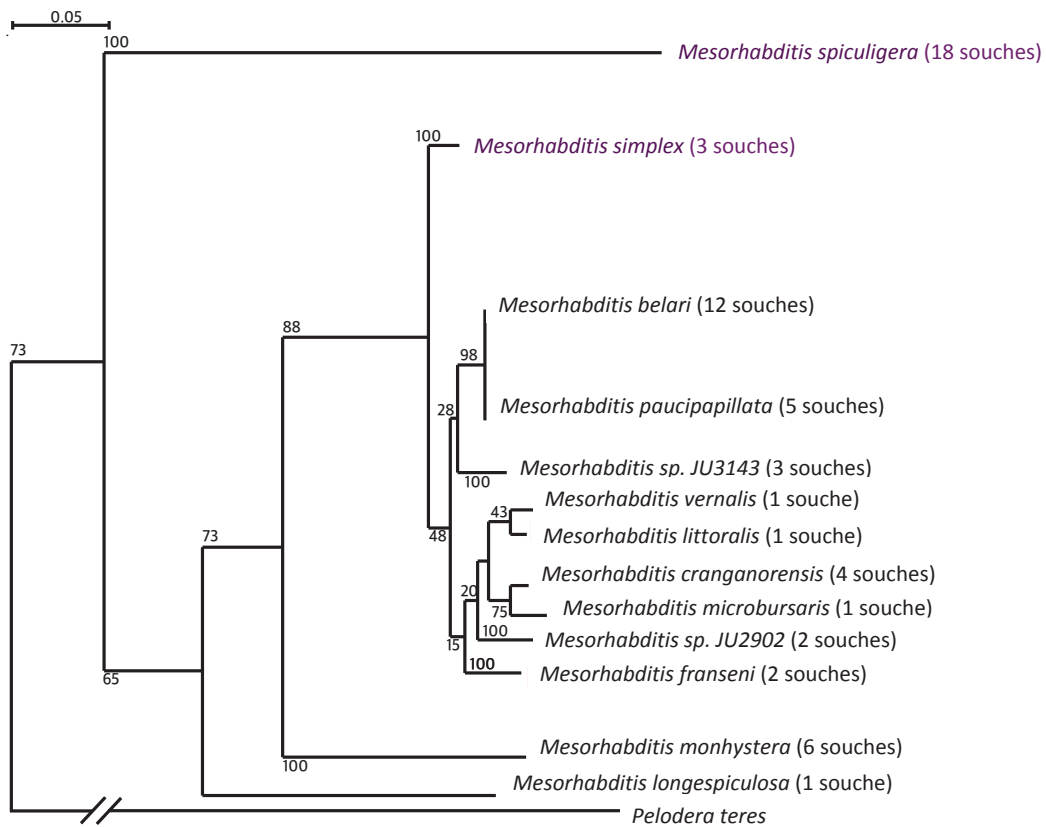
De tels spermatozoïdes pourraient aussi nous permettre de comprendre si des facteurs paternels sont responsables du devenir de l'ovocyte. Si la fécondation déclenche systématiquement un développement embryonnaire du type gynogénétique par exemple avec des spermatozoïdes anuclées, nous pourrions émettre l'hypothèse qu'un facteur paternel permet de déterminer le développement amphimixique de l'embryon.

La décondensation ou l'absence de décondensation pourrait aussi être liée à la quantité d'ADN maternel présent dans la cellule après la méiose femelle. Dans ce cas, nous pourrions détruire par ablation laser le pronoyau femelle et observer si l'ADN paternel se décondense systématiquement ou non. Si, en l'absence de pronoyau maternel, le pronoyau paternel se décondense systématiquement, ceci pourrait signifier qu'effectivement, un contenu diploïde en ADN maternel constitue un signal pour l'absence de décondensation de l'ADN paternel, ou qu'un contenu haploïde est nécessaire pour déclencher le signal de décondensation de l'ADN paternel.

## 5. Emergence de la pseudogamie

Depuis le début de ma thèse 59 souches de *Mesorhabditis* ont été échantillonnées et caractérisées. Parmi ces souches, certaines sont pseudogames et d'autre gonochoriques. En tout nous avons pu trouver 11 espèces pseudogames comprenant chacune une ou plusieurs souches différentes et deux espèces gonochoriques, une comprenant la souche DF5017 et une comprenant 18 souches. Un des projets du laboratoire auquel j'ai participé est de comprendre comment est apparue la pseudogamie au sein des *Mesorhabditis*.

Pour ce faire, Caroline Launay, ingénieure dans l'équipe, a réalisé le séquençage de marqueurs phylogénétiques (ITS, LSU, et 18S) afin d'établir un arbre phylogénétique du genre *Mesorhabditis*. Les premiers résultats tendent à montrer que la pseudogamie serait apparue une fois dans le genre *Mesorhabditis*, et que l'ancêtre commun serait une espèce gonochorique. Il semblerait donc que la pseudogamie soit apparue à partir d'un système de reproduction classique où les espèces sont composées de 50% de femelles et 50% de mâles, et où les embryons se développent tous de la même manière, avec mélange de l'ADN paternel et maternel (Figure 52).



**Figure 52: Arbre phylogénétique du genre *Mesorhabditis*.**

Les espèces pseudogames sont en noir et les espèces gonochoriques en violet. *Pelodera teres* constitue le groupe externe.

Afin que la pseudogamie ait pu émerger, il est nécessaire que plusieurs innovations cellulaires aient été mises en place :

- Les femelles doivent être capables de produire des embryons avec deux types de méioses différentes.

- L'ADN paternel doit pouvoir se décondenser ou rester condensé après son entrée dans l'ovocyte.

- Un couplage entre le devenir des ADN paternels et maternels dans l'ovocyte doit être mis en place.

- Le pourcentage de mâles doit pouvoir être régulé et maintenu à un pourcentage faible.

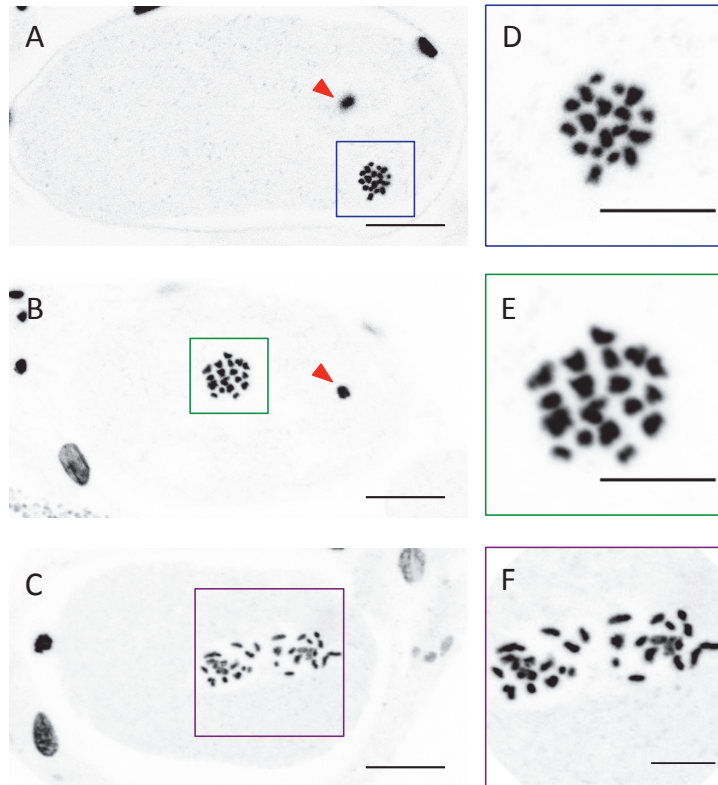
- Un mécanisme de déterminisme du sexe permettant à tous les individus recevant l'ADN paternel de devenir des mâles doit être mis en place.

Etant donné que les espèces pseudogames semblent avoir pour ancêtre commun une espèce gonochorique, nous nous sommes demandé quels ont été les mécanismes moléculaires et cellulaires qui ont été modifiés pour permettre l'émergence de ce mode de reproduction. Nous avons notamment cherché à comprendre si des mécanismes atypiques étaient déjà mis en place chez les espèces gonochoriques proches du genre *Mesorhabditis* et auraient pu permettre l'émergence de la pseudogamie. Nous avons profité de la présence de la souche DF5017, espèce gonochorique la plus proche des souches pseudogames au sein du genre *Mesorhabditis* pour effectuer cette recherche. Pour cela nous avons utilisé une approche cellulaire comparative entre la souche DF5017 et la souche JU2817.

De plus, plusieurs espèces pseudogames existent au sein du genre *Mesorhabditis*. Nous nous sommes demandé si cette stratégie de reproduction visiblement apparue selon la même combinaison d'innovations cellulaires et moléculaires avait évolué au cours des événements de spéciation. Pour cela, nous avons comparé certains paramètres connus chez *M. belari* avec ceux des autres espèces pseudogames à notre disposition.

### **5.1 Evolution du nombre de chromosomes au sein des *Mesorhabditis***

Dans un premier temps, nous avons cherché à connaître le type de déterminisme du sexe existant chez la souche *M. longespiculosa* DF5017. Pour cela nous avons tenté de réaliser un caryotype. Chez cette espèce, il a été très difficile de réaliser un caryotype puisqu'elle semble posséder un grand nombre de chromosomes (environ  $n=18$ ) (Figure 53). Il était difficile de séparer les chromosomes les uns des autres et donc de pouvoir compter avec précision leur nombre. Nous ne connaissons donc toujours pas le système de déterminisme du sexe chez cette espèce mais nous savons qu'elle possède beaucoup plus de chromosomes que la souche JU2817.



**Figure 53: Observation du nombre de chromosomes chez *M. longespiculosa* DF5017.**  
 L'ADN paternel est indiqué par une flèche rouge, le pronoyau femelle est encadré. (A, B) Embryons observés durant la métaphase de méiose 1 ou 2 ; (C) embryon observé durant la rencontre des pronoyaux paternels et maternels. (D, E, F) zoom réalisés sur les parties encadrées. (D, E) observation de 18 points distincts de taille variable. La barre d'échelle représente 10 $\mu$ m.

Cette souche est la plus proche des souches pseudogames, mais elle est éloignée de la souche JU2817 par rapport à d'autres espèces pseudogames. Nous avons voulu savoir s'il y avait une perte graduelle du nombre de chromosomes au sein des souches pseudogames ou bien si la pseudogamie s'est accompagnée d'une diminution brutale du nombre de chromosomes. Pour cela, nous avons réalisé des marquages au Hoechst sur des embryons de différentes souches pseudogames appartenant à des espèces différentes. Nous avons réalisé ces marquages sur 9 espèces pseudogames parmi les 11 connues et toutes ces espèces possèdent 10 chromosomes (Figure 54).

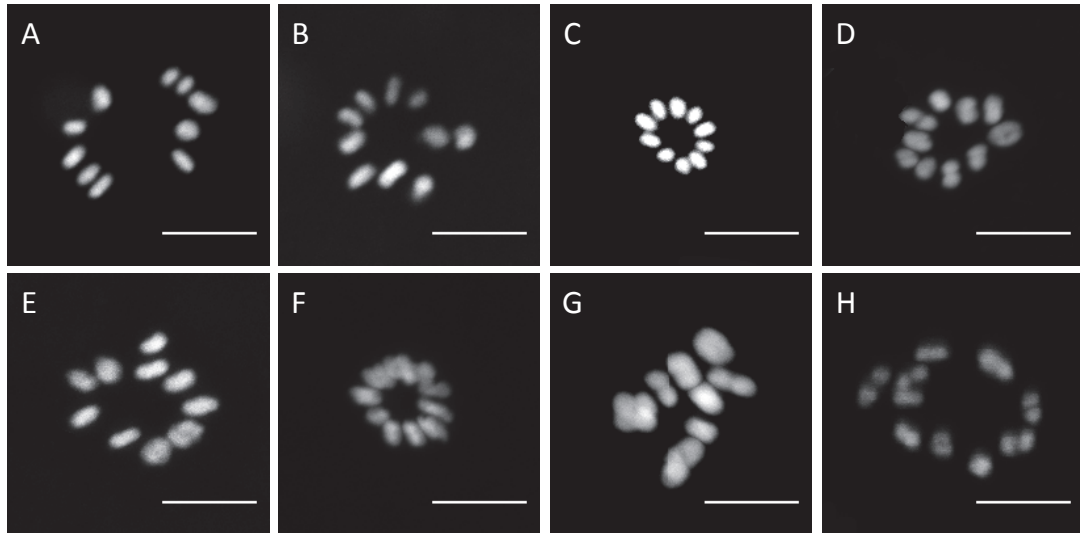


Figure 54: Marquage des chromosomes de différentes souches pseudogames avant la première division de méiose.

(A) *M. monhystera* souche JU2855 (B) *M. paucipapillata* souche JU2890 (C) *M. franseni* souche JU2870 (D) souche JU2902 (E) souche JU3148 (F) souche JU3208 (G) *M. vernalis* souche JU2848 (H) souche JU2864. La barre d'échelle représente 5µm.

De plus, un marquage des embryons de la souche JU2865 appartenant à la deuxième espèce gonochorique du genre *Mesorhabditis* a montré que cette espèce possède quant à elle 6 ou 7 chromosomes. Il semble donc qu'au sein des *Mesorhabditis*, le nombre de chromosomes ait évolué plusieurs fois. Il n'est pas improbable que ce changement ait permis l'émergence de nouveaux modes de reproduction (Figure 55).

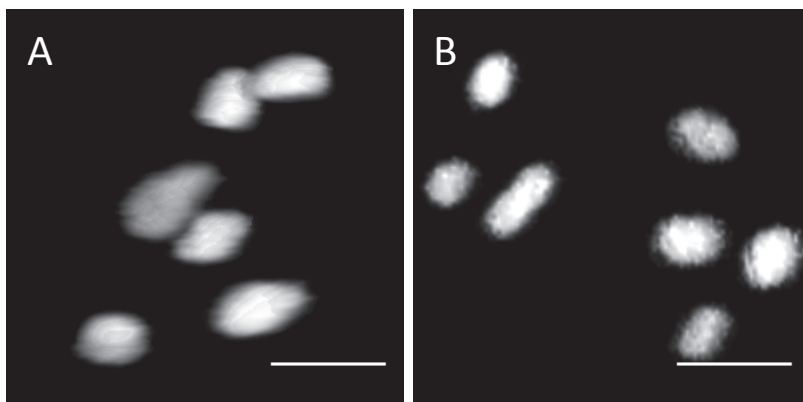


Figure 55: Observation des chromosomes dans l'ovocyte avant fécondation chez *M. spiculigera* JU2865.

(A) observation de 6 points distincts, (B) observation de 7 points distincts.

## 5.2 Analyse comparative de la gonade d'espèces pseudogames et gonochoriques

Afin de mieux comprendre quelles pouvaient être les modifications concernant la méiose chez les souches pseudogames, nous avons comparé les gonades de deux souches pseudogames à celles de deux souches gonochoristiques.

Pour cela, j'ai réalisé des dissections de gonades de mâles et de femelles des souches gonochoriques JU2865 et DF5017 et des souches pseudogames JU2887 et JU2817 et les ai marquées au DAPI et à la phalloïdine.

Les gonades des souches gonochoriques sont près de deux fois plus grandes que celles des souches pseudogames, tant pour les mâles que pour les femelles. Cette différence est corrélée avec la différence de taille des individus.

La seule différence marquante entre les gonades des souches pseudogames et celles des souches gonochoristiques ne se trouve pas au niveau du déroulement de la méiose mais au niveau de leur organisation (Figure 56). Les gonades des femelles gonochoriques sont syncytiales (comme chez *C. elegans*), c'est à dire que les noyaux partagent le même cytoplasme avant d'atteindre le stade diakinèse tandis que les gonades des femelles pseudogames ne le sont pas. Chez ces dernières, tous les noyaux sont entourés d'une membrane dès le début de la mitose. De plus, chez les femelles pseudogames, une seule cellule est au stade de la diakinèse à chaque fois, tandis que chez les femelles gonochoriques, plusieurs cellules sont observables à ce stade au même moment.

Les gonades des mâles gonochoriques sont quand à elles non syncytiales alors que les gonades des mâles pseudogames le sont. De plus, les mâles pseudogames semblent posséder plus de spermatozoïdes matures que les mâles gonochoriques.

Ces observations ne nous permettent pas de conclure quant aux différences qui sont apparues pour le contrôle de la méiose chez les mâles et les femelles pseudogames par rapport aux souches gonochoriques.

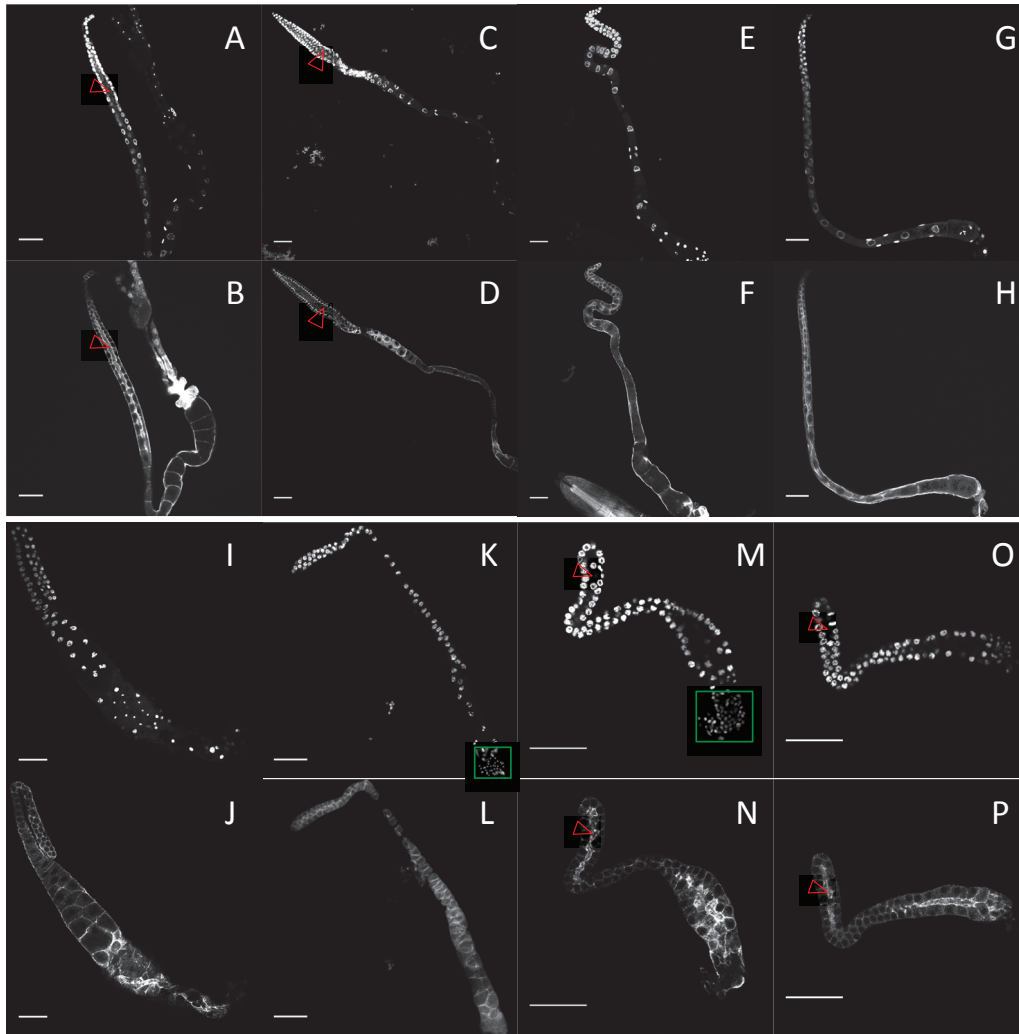


Figure 56: Comparaison des gonades de souches gonochoriques et pseudogames de *Mesorhabditis*. (A, B, I, J) souche gonochorique *M. spiculigera* JU2865; (C, D, K, L) souche gonochorique *M. longespiculosa* DF5017; (E, F, M, N) souche pseudogame *M. monystra* JU2887 (G, H, O, P) souche pseudogame *M. belari* JU2817. Panel haut, gonades femelles (A, C, E, G). Marquage des noyaux au Hoechst, (B, D, F, H) marquage des membranes cellulaires à la phalloïdine. Les gonades des femelles gonochoriques sont syncytiales, le rachis est indiqué par une flèche rouge, tandis que celles des pseudogames ne l'est pas (absence de rachis). Les femelles gonochoriques possèdent plus d'ovocytes en diakinèse que les femelles pseudogames. Panel bas, gonades mâles (I, K, M, O). Marquage des noyaux au Hoechst, (J, L, N, P) marquage des membranes cellulaires au DAPI. Les gonades des mâles pseudogames sont syncytiales, le rachis est indiqué par une flèche rouge, tandis que celles des gonochoriques ne l'est pas (absence de rachis). Les mâles pseudogames possèdent plus de spermatozoïdes dans la spermathèque (K et M encadré vert).

### 5.3 Analyse comparative du développement précoce des embryons d'une espèce pseudogame et d'une espèce gonochorique

Afin de comprendre ce qui différencie les embryons précoces des souches gonochoriques et pseudogames, nous avons filmé les embryons et réalisé un marquage des premières étapes lors du développement chez les souches JU2817 et



DF5017. Ces expériences n'ont pas révélé de différence frappante dans la dynamique de développement de ces embryons. En effet, chez les deux souches, l'ADN paternel reste condensé jusqu'à la fin de la méiose femelle, même si chez les souches gonochoriques l'ADN paternel se décondense pour chaque embryon (Figures 57 et 58). Toutefois, les chromosomes de la souche DF5017 semblent se condenser plus rapidement que les chromosomes de la souche JU2817 lors de la rencontre des pronoyaux, bien que la souche DF5017 compte plus de chromosomes que la souche JU2817.

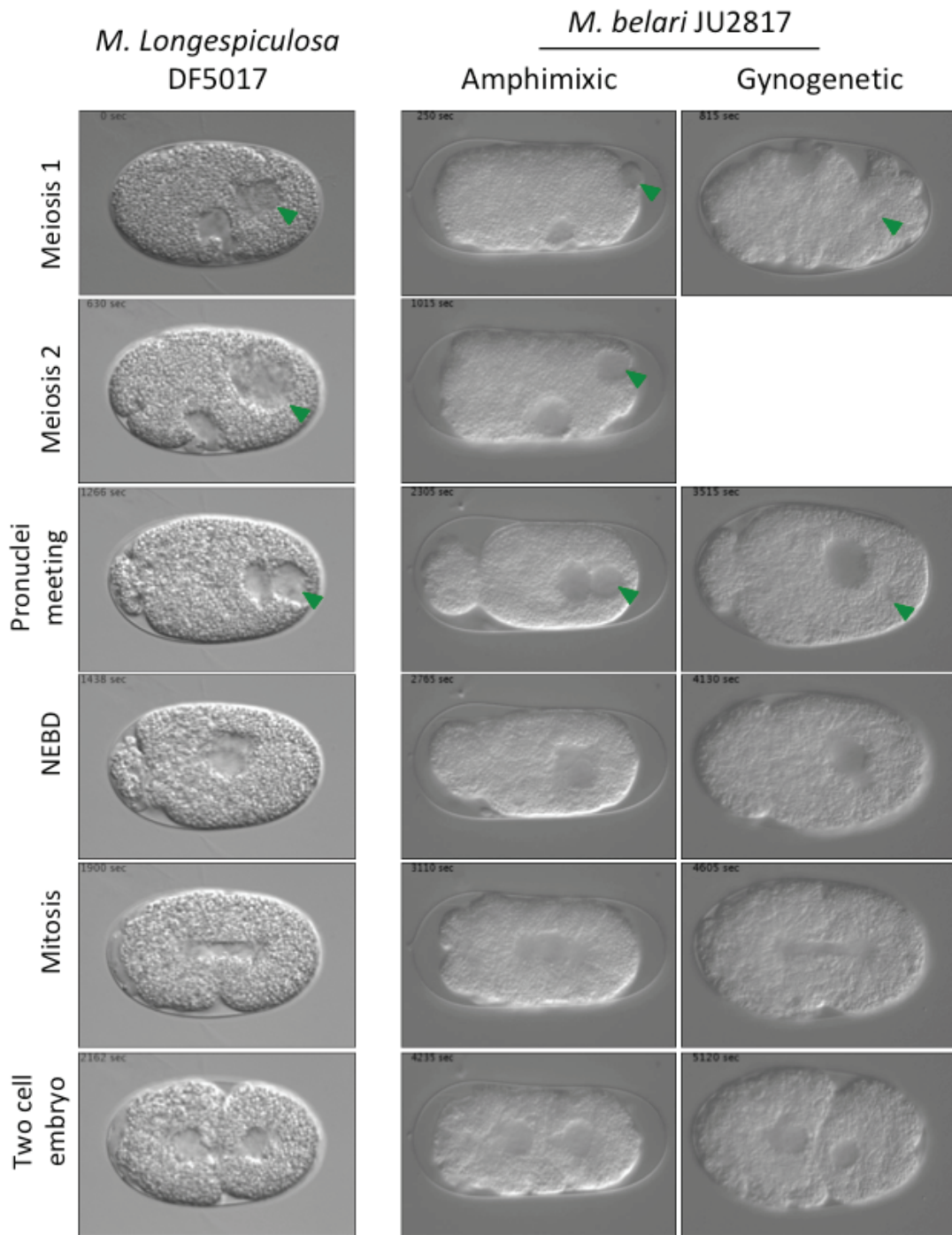


Figure 57: Comparaison des embryons produits par *M. longespiculosa* et *M. belari*. Images issues de films DIC depuis la première division de méiose femelle jusqu'au zygote au stade 2 cellules. Le pronoyau paternel est indiqué par une flèche verte.

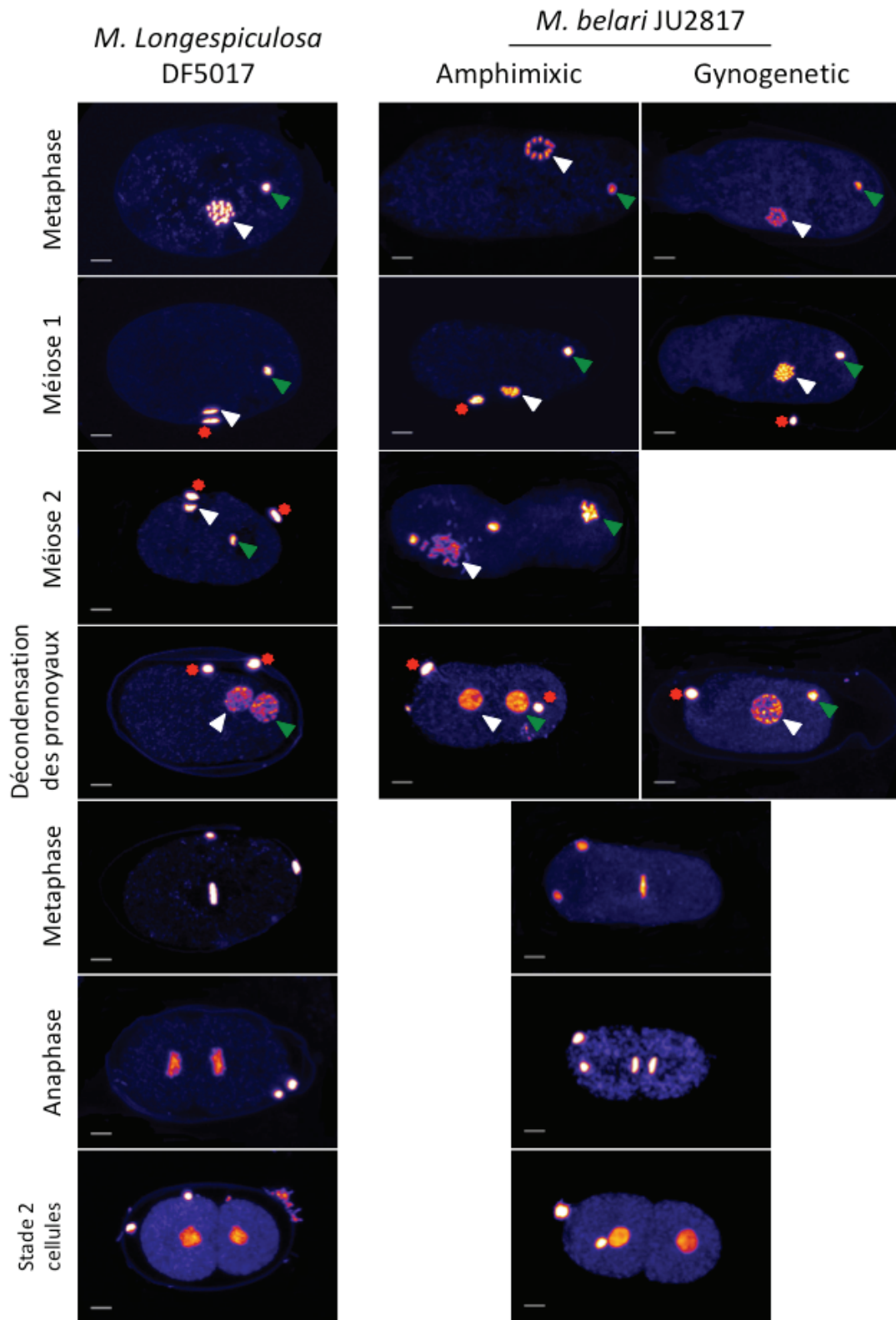


Figure 58: Comparaison des embryons produits par *M. longespiculosa* et *M. belari*.  
 Marquages d'embryons au Hoechst depuis la première division de méiose femelle jusqu'au zygote  
 au stade 2 cellules. L'ADN maternel est indiqué par une flèche blanche, l'ADN paternel par une  
 flèche verte et les globules polaires par une étoile rouge. La barre d'échelle est de 5 µm.

L'analyse comparative de ces souches n'a pas permis de mettre en évidence des changements majeurs au niveau du contrôle cellulaire des embryons. Ces différences auraient pu nous renseigner sur le type d'innovations cellulaires mises en place lors de l'émergence de la pseudogamie. Cependant, nous avons observé des différences au niveau de l'organisation de la gonade, mais nous ne pouvons pas dire si ces différences sont des causes ou des conséquences de ces modes de reproduction différents.

#### **5.4 Analyse du sex ratio dans les différentes espèces pseudogames**

Grâce à une analyse morphologique et à des croisements entre souches, nous avons pu déterminer qu'il existe bien 11 espèces de nématodes pseudogames au sein du genre *Mesorhabditis*. Les espèces définies par ce genre d'analyses sont en accord avec les espèces données par les arbres phylogénétiques. L'analyse phylogénétique semble montrer qu'il existe une seule occurrence de l'apparition de la pseudogamie au sein du genre *Mesorhabditis*. Nous pensons donc que les processus cellulaires et moléculaires nécessaires à ce mode de reproduction ont évolué une fois pour permettre l'émergence de ce mode de reproduction. Nous pensons aussi que, par la suite, le processus de spéciation a donné naissance à ces différentes espèces pseudogames. Ces espèces proviennent de régions géographiques différentes et présentent aussi des différences au niveau de leur morphologie. Nous nous sommes donc demandé si ces différentes espèces se différencieraient aussi du point de vue de l'optimisation du sex ratio. Pour répondre à cela, nous avons mesuré le pourcentage de mâles dans une souche de différentes espèces pseudogames à notre disposition. Le pourcentage de mâles semble assez stable pour les différentes espèces (environ 7 à 8%), mis à part pour la souche JU3143 qui présente un pourcentage plus faible (3 à 4%) (Figure 59). Ce résultat indique toutefois que chez toutes ces espèces, le sex ratio est inférieur à 10%. Il semblerait donc que le sex ratio optimum ne soit pas sensiblement différent entre les espèces pseudogames, et qu'une limite haute soit imposée à l'espèce pour se maintenir.

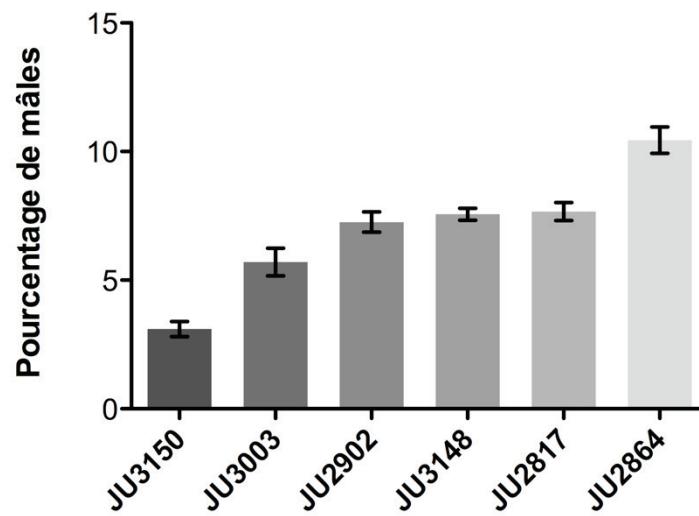


Figure 59: Sex ratio observés chez différentes espèces de *Mesorhabditis pseudogames*. Les graphes représentent le pourcentage de mâles observé pour chaque souche. JU3150 : *M. monhystera* ; JU3003 : *M. paucipapillata* ; JU2902 : *M. sp JU2902* ; JU3148 : *M. M. sp JU3143* ; JU2817 : *M. belari* ; JU2864 : *M. sp JU2864*

## 5.5 Conclusion et perspectives

### 5.5.1 Toutes les espèces pseudogames présentent un faible pourcentage de mâles

Le calcul du sex ratio chez les différentes espèces pseudogames a montré que toutes les espèces présentent un pourcentage de mâles faible, ne dépassant pas les 10%. Ce résultat est en adéquation avec la stratégie évolutivement stable proposée par le modèle mathématique développé par Pierre-Henri Gouyon. Ce résultat semble indiquer que le maintien d'un taux adéquat de mâles dans la population est un facteur déterminant pour la stabilité de la population. Une des souches de l'espèce *M. monhystera* présente un taux très faible de mâles d'environ 3%. Ce résultat reste encore à vérifier mais ceci pourrait indiquer qu'une proportion encore plus faible de mâles peut être atteinte dans la population. La migration chez cette souche pourrait par exemple être encore plus réduite, permettant le maintien de la population à des taux aussi bas de mâles. Dans cette espèce, il serait notamment intéressant de voir si 3% de mâles sont suffisants pour féconder toutes les femelles de la descendance. Dans ce cas, le nombre de spermatozoïdes produits par les mâles devrait être plus important si les femelles produisent le même nombre d'ovocytes, ou bien le nombre d'ovocytes produits par une femelle devrait être moins important que chez les autres espèces pseudogames.

### 5.5.2 Les mâles des espèces pseudogames semblent présenter un déclin des caractères sexuels

Dans les espèces pseudogames, il ne semble pas y avoir de compétition entre les mâles pour l'accès à la reproduction. En accord avec cette hypothèse, les mâles présentent une mobilité limitée et une atrophie des appendices sexuels ainsi qu'une taille et une mobilité des spermatozoïdes réduites. Ce phénomène n'est pas observé chez les espèces gonochoriques où la compétition pour l'accès aux femelles est plus importante et donc potentiellement la sélection sexuelle aussi. Le déclin des traits sexuels est généralement observé, notamment chez les mâles occasionnellement produits au sein des espèces asexuées (van der Kooi and Schwander, 2014).

### 5.5.3 Pistes pour l'étude de l'émergence de la pseudogamie

Plusieurs autres différences existent entre les espèces gonochoriques et les espèces pseudogames. Tout d'abord, chez les *Mesorhabditis*, comme chez les autres nématodes, la gonade est organisée de manière temporelle, cependant, certaines différences existent entre les espèces ne possédant pas le même type de reproduction. Chez les espèces gonochoriques, la gonade des femelles est syncytiale alors que celle des mâles ne l'est pas. Chez les espèces pseudogames, c'est l'inverse qui est observé. Pour les femelles pseudogames, une gonade non syncytiale pourrait permettre une détermination précoce de l'embryon en devenir, en permettant par exemple la compartimentation spécifique de facteurs nécessaires au développement gynogénétique ou amphimixique. Par ailleurs, si des facteurs responsables du devenir de l'embryon sont identifiés par l'analyse transcriptomique comparative entre les deux types d'embryons, il serait alors possible de réaliser des expériences de RNA FISH sur des gonades pour distinguer la présence de ces facteurs seulement dans certaines cellules plutôt que dans toutes les cellules de la gonade femelle.

De plus, le nombre de chromosomes chez les différentes espèces n'est pas le même. Alors que toutes les espèces pseudogames possèdent 10 chromosomes, les deux espèces gonochoriques en possèdent soit 18, soit 6 ou 7. Nous n'avons pas commencé à chercher pourquoi les femelles d'une même espèce pouvaient posséder 6 ou 7 chromosomes.

Il semblerait donc qu'au sein du genre *Mesorhabditis* le nombre de chromosomes ait évolué plusieurs fois, permettant peut-être, par des réarrangements chromosomiques, l'émergence d'un nouveau mode de reproduction. Le séquençage et l'assemblage du génome de l'espèce *M. longespiculosa* pourrait permettre de comprendre quels types de réarrangements chromosomiques ont eu lieu dans les espèces pseudogames. En effet, par synténie, il serait possible de comprendre si des chromosomes ont par exemple fusionné. Ces mécanismes pouvant potentiellement avoir permis l'émergence de la pseudogamie. De plus, l'apparition d'un chromosome proto-Y peut être due à la translocation d'un fragment de chromosome au niveau d'un autre chromosome. L'espèce *M.*

*longespiculosa* pourrait alors posséder un autre type de déterminisme du sexe que les espèces pseudogames. Il est notamment considéré que certains types de déterminisme du sexe sont moins compatibles que d'autres avec l'émergence d'un mode de reproduction asexuée. Des réarrangements chromosomiques pourrait alors avoir permis de remplacer un type de déterminisme contraignant l'apparition d'un mode de reproduction asexuée par un type de déterminisme plus permissif à ce type d'évolution.

Chez l'espèce de nématode *Diploscapter pachys*, l'émergence de la parthénogénèse est notamment corrélée à la fusion des 6 chromosomes présents chez son ancêtre en un seul (Fradin et al., 2017). L'analyse cytologique a permis de montrer que l'appariement des chromosomes homologues et la recombinaison ne se produisent pas, les gamètes semblent donc être produits par apomixie. Cette fusion aurait pu permettre l'apparition de cette méiose alternative.

Grâce au séquençage du génome, nous avons pu évaluer la conservation des acteurs du processus méiotique chez *M. belari* par rapport à plus de 70 espèces de nématodes déjà séquencés. La plupart des protéines responsables de la méiose sont retrouvées par homologie chez *M. belari*, seules quelques protéines, comme COH-3, ne sont pas conservées.

Il semble difficile de mettre en lien l'absence d'une telle protéine avec l'émergence de la pseudogamie puisque cette absence d'homologie est aussi observée chez des espèces gonochoriques et phylogénétiquement proches de *M. belari*, indiquant que ces protéines pourraient évoluer rapidement.

Le séquençage du génome des mâles et des femelles séparés de l'espèce *M. longespiculosa* a été réalisé. L'assemblage de ce génome et son analyse comparée avec celui de *M. belari* pourrait nous permettre de comprendre quels mécanismes sont à l'origine du mode de reproduction pseudogame. Le séquençage séparé des deux sexes pourra aussi nous permettre de comprendre si, au cours de l'évolution, le système de déterminisme du sexe a été modifié. De plus, l'analyse génomique permettrait de comparer l'évolution du génome de deux espèces proches mais ne



présentant pas le même type de reproduction, et donc de comprendre l'impact de la pseudogamie sur l'évolution du génome.

Malgré des résultats très préliminaires, l'équipe est maintenant en possession d'un système lui permettant d'étudier l'émergence et l'évolution de la pseudogamie. En effet, nous pouvons à présent comparer des espèces pseudogames entre elles ainsi que des espèces pseudogames avec des espèces gonochoriques proches. De plus, de nombreuses données de génomique et transcriptomique ont été obtenues pour plusieurs espèces de *Mesorhabditis*. Les espèces pseudogames et gonochoriques présentent de nombreuses divergences, une analyse génomique et cytologique comparée de ces deux types d'espèces constituerait un avantage certain pour la compréhension des processus nécessaires à l'émergence d'un nouveau mode de reproduction.

# Conclusion générale

---

Contrairement aux espèces pseudogames décrites jusqu'alors, les nématodes du genre *Mesorhabditis* n'utilisent pas les mâles d'autres espèces pour féconder leurs ovocytes mais produisent leurs propres mâles. Le fait de produire des mâles dans une espèce comporte de nombreux coûts associés tels que la recherche d'un partenaire pour la reproduction. Chez les espèces produisant des mâles il existe alors des avantages en retour pour compenser ces coûts, tel que la variabilité génétique apportée par le mélange des ADN paternel et maternel. Cependant, chez *M. belari* les femelles ne semblent pas avoir d'avantage direct d'un point de vue génétique à produire des mâles puisque ceux-ci ne participent pas à la diversité génétique dans la population et ne transmettent pas leurs gènes à la génération suivante à leurs filles. Ce travail nous a permis de montrer que chez *M. belari*, l'absence d'avantages apportée par la production de mâles est contrôlée par une faible proportion de ces mâles dans la population. En effet, les femelles semblent produire juste suffisamment de mâles pour que toutes les femelles de la descendance soient fécondées.

Cependant, dans d'autres espèces où le sex ratio est de 50%, peu de mâles seraient aussi capables de féconder toute la descendance femelle. Or, dans ces populations, le sex ratio n'est pas modifié et n'atteint pas celui où le nombre de mâles serait le nombre minimum pour féconder toute la descendance femelle (autrement dit il y a beaucoup plus de mâles et de spermatozoïdes que nécessaire pour féconder toutes les femelles). La théorie développée par Fisher propose une explication concernant le fait que la plupart des espèces sexuées possèdent un sex ratio de 50%. Dans une population où le même coût est associé à la production des mâles et des femelles, autant d'individus des deux sexes devraient être produits. En effet, dans une population où un des sexes est majoritaire, les parents produisant des individus de l'autre sexe auront une fitness plus importante puisque leurs enfants auront plus d'opportunité de reproduction en étant le sexe minoritaire dans la population. Ainsi, si plus de femelles sont produites dans la population, un couple

produisant des mâles aura une fitness plus importante qu'un couple produisant des femelles, et inversement. Si le coût de production pour un mâle est le même que celui pour une femelle, alors le sex ratio dans la population devrait être de 50%. Dans le cas de *M. belari*, produire un mâle est plus coûteux pour une femelle puisqu'il ne transmet pas ses gènes aux futures générations et ne semble pas participer à la diversité génétique. De plus, plusieurs facteurs (génétiques et environnementaux) semblent favoriser la reproduction entre la descendance d'une même mère. Ceci permet alors aux femelles de s'assurer que les mâles produits participeront à la fécondation de leur descendance. Ces facteurs restent indéterminés même si nous avons pu montrer qu'ils semblent aussi jouer sur la proportion de mâles dans la population.

L'ajout de phéromones notamment permet de valider les résultats obtenus par Victor Nigon, à savoir que moins de mâles sont produits dans la descendance lorsque la population est mise en présence d'un milieu ayant accueilli au préalable une grande population. Il est possible que le signal des phéromones indique aux femelles que la population est importante, en réponse à cela, les femelles produiraient moins de mâles. Cette diminution pourrait permettre d'éviter que les fils d'une femelle fécondent les filles d'autres femelles, la migration pouvant être augmentée en raison de la déprivation de ressources plus importante à mesure que la taille de population augmente. Notre modèle mathématique indique par ailleurs que dans une population panmictique, le sex ratio serait égal à 0, et que la population s'éteindrait. Ce système ne semble donc pas viable au long cours, et la faible proportion d'embryons produits par une même femelle par rapport aux autres espèces de nématodes pourrait permettre de maintenir une population peu importante, et donc une moins grande consommation des ressources, entraînant ainsi une migration plus faible et le maintien d'un faible pourcentage de mâles.

Les individus frères et sœurs produisent par ailleurs plus de mâles que des individus non apparentés. Cette différence pourrait aussi être à l'origine de la préférence des mâles pour leur sœur puisque la seule possibilité pour eux de transmettre leurs gènes est de produire des mâles. En se reproduisant avec leur sœur, ils assurent donc une plus grande transmission de leur patrimoine à leur descendance. Les femelles peuvent aussi avoir un intérêt à produire un plus fort

pourcentage de mâles lorsqu'elles s'accouplent avec des frères, elles pourraient ainsi produire des fils qui auraient plus de chance de préférer leurs filles. Dans ce sens, on pourrait aussi observer une plus faible production de mâles lorsque la population est mise en présence de phéromones, cet ajout pourrait masquer la reconnaissance dépendante des phéromones entre les individus.

Bien que les femelles puissent produire des embryons gynogénétiques, elles ont toujours la capacité de produire des embryons amphimixiques. Il semblerait donc que la machinerie du développement embryonnaire ait acquis de nouvelles fonctionnalités permettant de contrôler une méiose incomplète ainsi que l'absence de décondensation de l'ADN paternel, tout en maintenant celles permettant le développement d'embryons amphimixiques.

La plupart des espèces gynogénétiques sont apparues à la suite d'événements d'hybridation, entraînant la possibilité pour les femelles gynogénétiques d'être fécondées par des mâles d'une autre espèce et annulant pour elles la nécessité de continuer à produire des mâles. Il est possible que chez *M. belari*, la pseudogamie soit apparue de manière spontanée à partir d'une espèce gonochorique, entraînant la nécessité de maintenir une proportion de mâles capables de féconder leurs ovocytes.

Il a notamment été démontré dans l'équipe que la barrière d'espèce est présente dans ces populations, les croisements entre différentes espèces pseudogames de *Mesorhabditis* ne permettent pas de produire une descendance viable. Il semblerait donc que les femelles *M. belari* ne puissent pas utiliser les spermatozoïdes des mâles d'une autre espèce pour féconder leurs ovocytes. L'hypothèse de l'apparition spontanée de femelles gynogénétiques au sein d'une population gonochorique est corroborée par le fait que l'apparition de femelles gynogénétiques a été observée dans des cultures de laboratoire par P. Hertwig en 1920. Deux populations se sont distinguées, l'une de femelles ne produisant que des femelles et l'autre des femelles produisant des mâles et des femelles. La population produisant seulement des femelles, se reproduisait par gynogenèse, et l'ajout de mâles provenant de l'autre population était nécessaire au maintien de la population gynogénétique. Dans ce cas, les femelles gynogénétiques semblaient avoir perdu la

capacité de produire des embryons amphimixiques, ce qui n'est pas le cas de *M. belari*. Sans les mâles de l'espèce gonochoriques, elles étaient donc incapables de produire de nouveaux individus, même femelle.

Au sein de l'espèce ancestrale gonochorique de *M. belari*, une femelle pseudogame aura à priori une fitness plus importante. En effet, si le nombre d'individus pondus est le même pour une femelle gonochorique qu'une femelle pseudogame, la femelle pseudogame pondra, en comparaison, plus de femelles qu'une femelle gonochorique, entraînant potentiellement l'envahissement de la population gonochorique par la population pseudogame. Dans ce cas, la capacité de produire une partie d'embryons destinés à devenir des mâles leur aurait permis de se maintenir une fois la population gonochorique déplacée.

Les femelles ayant besoin des spermatozoïdes des mâles afin de produire des embryons, l'évolution vers la parthénogénèse semble donc contrainte par le déclenchement embryonnaire et l'apport des centrosomes par le spermatozoïde. Les femelles ne peuvent donc pas se passer de la production de mâles mais semblent l'avoir réduite à la proportion congrue pour la fécondation optimale de la génération suivante. Cependant, des mécanismes de méiose leur permettant de produire des embryons diploïdes sans utiliser l'ADN paternel sont apparus. L'étude de ces mécanismes pourrait nous renseigner sur l'évolution des processus cellulaires permettant l'émergence de la pseudogamie chez *Mesorhabditis*.

Ce type de reproduction semble entraîner la dilution du génome des mâles dans celui des femelles. En effet, nous avons pu montrer qu'il n'existe pas de transmission générale préférentielle du génome paternel aux fils. Les fils hériteraient donc d'une moitié aléatoire de génome paternel et maternel, et transmettraient aussi aléatoirement une moitié de ce génome à leur fils. Cependant, la décondensation de l'ADN paternel entraîne systématiquement le développement des embryons en mâles. Il semblerait donc qu'un facteur responsable de la masculinisation soit transmis systématiquement au fils par leur père, la présence de nombreux gènes dupliqués dans les mêmes régions chromosomiques chez les mâles pourrait indiquer la présence d'un chromosome Y. Ces séquences pourraient être

dupliquées simplement en raison de la dégénérescence du chromosome Y, ou bien elles pourraient avoir un rôle dans le déterminisme du sexe ou la fitness des mâles.

Chez les organismes présentant un déterminisme génétique du sexe, un facteur primaire du déterminisme du sexe est présent. Lors de l'évolution du chromosome Y, des séquences favorisant la fertilité et la fitness des mâles apparaissent et se trouvent liées à ce facteur. La nature des gènes dupliqués chez *M. belari* dans le déterminisme du sexe ou la fitness n'est pour le moment pas démontrée. Ce type de démonstration nécessiterait la mise en place d'une étude génétique basée sur la suppression ou la surexpression de ces gènes dans les deux sexes. De telles études ont permis de montrer l'implication de gènes dans le déterminisme du sexe chez plusieurs espèces comme *C. elegans* ou la drosophile.

De plus, il serait intéressant d'étudier l'expression de ces gènes, en effet, leur présence en plus grand nombre chez les mâles n'indique pas que ces gènes soient plus exprimés, ni à quel moment du développement. De telles duplications pourraient aussi être à l'origine d'un système de meiotic drive comme la duplication en tandem d'une séquence de 6 gènes chez *Drosophila simulans* (Fouvry et al., 2011)

Dans ce cas, un conflit entre les sexes devrait émerger, les mâles tirant profit de la production de plus de mâles pour la transmission de loci spécifiques et les femelles tirant profit de la production d'un nombre restreint de mâles. Les mâles pourraient alors avoir développé un système permettant d'octroyer à chaque spermatozoïde le facteur paternel, pour assurer la production d'un mâle dès que le génome paternel est utilisé, et les femelles adoptant un mécanisme permettant de décondenser cet ADN paternel seulement dans une certaine proportion. Ce cas pourrait s'apparenter aux espèces haplo-diploïdes pour lesquelles les femelles peuvent permettre ou restreindre l'accès des spermatozoïdes aux ovocytes après la copulation.

L'impact de la fitness des mâles sur la proportion de fils dans leur descendance semble compliqué à comprendre puisque l'issue de la méiose femelle précède la décision prise quant à la décondensation l'ADN paternel. Cependant, il a été montré que les spermatozoïdes apportent des facteurs paternels dans certaines autres espèces, on pourrait donc penser que l'apport d'un de ces facteurs dicte le devenir de l'ADN maternel. Dans ce cas, il semblerait étrange d'observer si peu de

mâles dans la population puisqu'un tel contrôle de la part des mâles entraînerait potentiellement la production de plus de mâles dans la population.

Nos observations des embryons indiquent qu'il existe un lien systématique entre l'état de l'ADN paternel et le type de méiose femelle. L'origine du contrôle du devenir de l'embryon reste cependant inconnue, il est possible en effet que l'état de l'ADN paternel dicte le déroulement de la méiose, ou bien que le déroulement de la méiose femelle dicte le devenir paternel, ou encore qu'aucun lien direct n'existe entre ces deux régulations et qu'un facteur présent dans l'ovocyte permette de réguler à la fois la méiose femelle et la décondensation de l'ADN paternel. L'analyse transcriptomique des deux types d'embryons pourrait permettre de répondre à cette question.

Les résultats de croisements ainsi que l'établissement de la phylogénie des *Mesorhabditis* réalisés dans l'équipe ont montré que plusieurs espèces gonochoriques et pseudogames existent au sein de ce genre. De plus, la phylogénie tend à montrer que la pseudogamie serait apparue une fois au sein de *Mesorhabditis*. L'observation de plusieurs espèces distinctes de pseudogames indique que ce mode de reproduction permet la spéciation. De plus, seules deux souches de *Mesorhabditis* gonochoriques ont été identifiées

Ceci pourrait indiquer que la pseudogamie entraîne un plus fort taux de spéciation que le gonochorisme. Ceci pourrait potentiellement être dû à leur dynamique de reproduction. Si la reproduction entre individus apparentés est préférée, ceci pourrait entraîner une séparation plus rapide de certaines populations, notamment si la migration est réduite. Les espèces séparées physiquement et se reproduisant entre individus apparentées auraient donc tendance à se différencier plus facilement d'un point de vue génomique. Les flux géniques entre population seraient en effet réduits chez les mâles et les mêmes combinaisons de gènes seraient facilement maintenues au sein d'une même population de par la reproduction clonale des femelles.

Pour conclure, nous avons pu mettre en lumière un type de reproduction jusqu'alors inconnu à notre connaissance. Ce système se démarque notamment des

espèces pseudogames déjà décrites qui ne produisent pas leurs propres mâles. La combinaison d'approches cellulaires, génétiques et génomiques pourra par la suite permettre la compréhension des mécanismes cellulaires qui ont permis l'émergence de la pseudogamie, mais aussi des conséquences de ce type de reproduction sur l'évolution du génome de la population. La multiplication des axes de recherche concernant cette espèce pendant ma thèse a été principalement due au fait que de nombreuses questions différentes ont été soulevées au fur et à mesure de la progression de nos travaux. Même si, parmi tous les projets que j'ai initiés, peu ont pu aboutir, mes résultats préliminaires ont permis de préciser les axes importants de recherche pour continuer à explorer la biologie de l'espèce *M. belari*.



# Bibliographie

---

- Abbott, J.K., Nordén, A.K., and Hansson, B. (2017). Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. *Proc. Biol. Sci.* 284.
- Abramenko, M. (1998). Discovery of triploid males in lower Don populations of the crucian carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch). *Dokl. Akad. Nauk* 415–418.
- Aït-Ahmed, O., Bellon, B., Capri, M., Joblet, C., and Thomas-Delaage, M. (1992). The yemanuclein-alpha: a new *Drosophila* DNA binding protein specific for the oocyte nucleus. *Mech. Dev.* 37, 69–80.
- Akama, K., Kondo, M., Sato, H., and Nakano, M. (1999). Transition protein 4 from boar late spermatid nuclei is a topological factor that stimulates DNA-relaxing activity of topoisomerase I. *FEBS Lett.* 442, 189–192.
- Akhmanova, A., Miedema, K., Wang, Y., van Bruggen, M., Berden, J.H., Moudrianakis, E.N., and Hennig, W. (1997). The localization of histone H3.3 in germ line chromatin of *Drosophila* males as established with a histone H3.3-specific antiserum. *Chromosoma* 106, 335–347.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, A.J., Sánchez, M.I., Figuerola, J., and Hortas, F. (2005). The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biol. Invasions* 7, 37–47.
- Anderson, L.M., Riffle, L., Wilson, R., Travlos, G.S., Lubomirski, M.S., and Alvord, W.G. (2006). Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 22, 327–331.
- Andersson, M.B. (1994). *Sexual Selection* (Princeton University Press).
- Aravind, L., and Koonin, E.V. (1998). The HORMA domain: a common structural denominator in mitotic checkpoints, chromosome synapsis and DNA repair. *Trends Biochem. Sci.* 23, 284–286.
- Archetti, M. (2004). Recombination and loss of complementation: a more than two-fold cost for parthenogenesis. *J. Evol. Biol.* 17, 1084–1097.
- Arico, J.K., Katz, D.J., Vlag, J. van der, and Kelly, W.G. (2011). Epigenetic Patterns Maintained in Early *Caenorhabditis elegans* Embryos Can Be Established by Gene Activity in the Parental Germ Cells. *PLOS Genet.* 7, e1001391.
- Arnqvist G, R. (2005). *Sexual Conflict*.
- Ausió, J. (1999). Histone H1 and Evolution of Sperm Nuclear Basic Proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 31115–31118.
- Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Roest, H.P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J.H., and Grootegoed, J.A. (1999). Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* 207, 322–333.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227.

- Balhorn, R., Gledhill, B.L., and Wyrobek, A.J. (1977). Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry (Mosc.)* 16, 4074–4080.
- Barckmann, B., Chen, X., Kaiser, S., Jayaramaiah-Raja, S., Rathke, C., Dottermusch-Heidel, C., Fuller, M.T., and Renkawitz-Pohl, R. (2013). Three levels of regulation lead to protamine and Mst77F expression in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 377, 33–45.
- Barnes, T.M., Kohara, Y., Coulson, A., and Hekimi, S. (1995). Meiotic recombination, noncoding DNA and genomic organization in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141, 159–179.
- Baudat, F., Manova, K., Yuen, J.P., Jasin, M., and Keeney, S. (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol. Cell* 6, 989–998.
- Bayer, M., Nawy, T., Giglione, C., Galli, M., Meinel, T., and Lukowitz, W. (2009). Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 323, 1485–1488.
- Bean, C.J., Schaner, C.E., and Kelly, W.G. (2004). Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 36, 100–105.
- Bell, G. (1982). *The Masterpiece of Nature :: The Evolution and Genetics of Sexuality* (CUP Archive).
- Bernstein, H., Byerly, H.C., Hopf, F.A., and Michod, R.E. (1985). Genetic damage, mutation, and the evolution of sex. *Science* 229, 1277–1281.
- Berven, K.A. (1981). MATE CHOICE IN THE WOOD FROG, *RANA SYLVATICA*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 35, 707–722.
- Beukeboom, L.W., and Vrijenhoek, R.C. (1998). Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. *J. Evol. Biol.* 11, 755–782.
- Beukeboom, L.W., and Werren, J.H. (2000). The paternal-sex-ratio (PSR) chromosome in natural populations of *Nasonia* (Hymenoptera Chalcidoidea).
- Beukeboom, L.W., Kamping, A., and van de Zande, L. (2007). Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): a critical consideration of models and evidence. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 371–378.
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M.K., Page, R.E., and Omholt, S.W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114, 419–429.
- Bhalla, N., Wynne, D.J., Jantsch, V., and Dernburg, A.F. (2008). ZHP-3 acts at crossovers to couple meiotic recombination with synaptonemal complex disassembly and bivalent formation in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 4, e1000235.
- Blankenhorn, H.J. (1977). Reproduction and Mating Behavior in *Rana Lessonae* — *Rana Esculenta* Mixed Populations. In *The Reproductive Biology of Amphibians*, (Springer, Boston, MA), pp. 389–410.

- Bourke, A. F. G. and Franks, N. R. 1995. (1995). *Social Evolution in Ants*. Princet. Univ. Press.
- Braun, R.E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet.* 28, 10–12.
- Bretagnolle, F., and Thompson, J.D. (1995). Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol.* 129, 1–22.
- Browning, H., and Strome, S. (1996). A sperm-supplied factor required for embryogenesis in *C. elegans*. *Dev. Camb. Engl.* 122, 391–404.
- Bull, J.J. (1985). Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. *Experientia* 41, 1285–1296.
- Bullini, L. (1994). Origin and evolution of animal hybrid species. *Trends Ecol. Evol.* 9, 422–426.
- Butlin, R. (2002). Evolution of sex: The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages. *Nat. Rev. Genet.* 3, 311–317.
- Cagniant, H. (1983). La parthénogenèse thélytoque et arrhénotoque des ouvrières de la fourmi *Cataglyphis cursor* Fonscolombe (Hymenoptères formicidae) étude biométrique des ouvrières et de leurs potentialités reproductrices. *Insectes Sociaux* 30, 241–254.
- Carrell, D.T., Emery, B.R., and Hammoud, S. (2007). Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum. Reprod. Update* 13, 313–327.
- de Carvalho, C.E., Zaaier, S., Smolikov, S., Gu, Y., Schumacher, J.M., and Colaiácovo, M.P. (2008). LAB-1 antagonizes the Aurora B kinase in *C. elegans*. *Genes Dev.* 22, 2869–2885.
- Chan, R.C., Chan, A., Jeon, M., Wu, T.F., Pasqualone, D., Rougvie, A.E., and Meyer, B.J. (2003). Chromosome cohesion is regulated by a clock gene paralogue TIM-1. *Nature* 423, 1002–1009.
- Chang, L., Loranger, S.S., Mizzen, C., Ernst, S.G., Allis, C.D., and Annunziato, A.T. (1997). Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 469–480.
- Chapman, D.D., Shivji, M.S., Louis, E., Sommer, J., Fletcher, H., and Prodöhl, P.A. (2007). Virgin birth in a hammerhead shark. *Biol. Lett.* 3, 425–427.
- Chapman, D.D., Firchau, B., and Shivji, M.S. (2008). Parthenogenesis in a large-bodied requiem shark, the blacktip *Carcharhinus limbatus*. *J. Fish Biol.* 73, 1473–1477.
- Charlesworth, B. (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.* CB 6, 149–162.
- Chen, H.Y., Sun, J.M., Zhang, Y., Davie, J.R., and Meistrich, M.L. (1998). Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J. Biol. Chem.* 273, 13165–13169.

- Chin, G.M., and Villeneuve, A.M. (2001). *C. elegans mre-11* is required for meiotic recombination and DNA repair but is dispensable for the meiotic G(2) DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 15, 522–534.
- Choleva, L., Janko, K., De Gelas, K., Bohlen, J., Šlechtová, V., Rábová, M., and Ráb, P. (2012). Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 66, 2191–2203.
- Chu, D.S., Liu, H., Nix, P., Wu, T.F., Ralston, E.J., Yates, J.R., and Meyer, B.J. (2006). Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature* 443, 101–105.
- Clarkson, M.J., Wells, J.R., Gibson, F., Saint, R., and Tremethick, D.J. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* 399, 694–697.
- Colaiácovo, M.P., MacQueen, A.J., Martinez-Perez, E., McDonald, K., Adamo, A., La Volpe, A., and Villeneuve, A.M. (2003). Synaptonemal complex assembly in *C. elegans* is dispensable for loading strand-exchange proteins but critical for proper completion of recombination. *Dev. Cell* 5, 463–474.
- Cook, J.M. (1993). Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* 71, 421–435.
- Couteau, F., and Zetka, M. (2005). HTP-1 coordinates synaptonemal complex assembly with homolog alignment during meiosis in *C. elegans*. *Genes Dev.* 19, 2744–2756.
- Couteau, F., Nabeshima, K., Villeneuve, A., and Zetka, M. (2004). A component of *C. elegans* meiotic chromosome axes at the interface of homolog alignment, synapsis, nuclear reorganization, and recombination. *Curr. Biol. CB* 14, 585–592.
- Cowell, I.G., Aucott, R., Mahadevaiah, S.K., Burgoyne, P.S., Huskisson, N., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Wu, R., et al. (2002). Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma* 111, 22–36.
- Crittenden, S.L., Troemel, E.R., Evans, T.C., and Kimble, J. (1994). GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line. *Dev. Camb. Engl.* 120, 2901–2911.
- Crittenden, S.L., Leonhard, K.A., Byrd, D.T., and Kimble, J. (2006). Cellular analyses of the mitotic region in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *Mol. Biol. Cell* 17, 3051–3061.
- Crozier, R.H. (1971). Heterozygosity and Sex Determination in Haplo-Diploidy. *Am. Nat.* 105, 399–412.
- Cuenca, J., Aleza, P., Juárez, J., García-Lor, A., Froelicher, Y., Navarro, L., and Ollitrault, P. (2015). Maximum-likelihood method identifies meiotic restitution mechanism from heterozygosity transmission of centromeric loci: application in citrus. *Sci. Rep.* 5, 9897.
- D Charlesworth, and Charlesworth, and B. (1987). Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 237–268.
- Daniel, K., Lange, J., Hached, K., Fu, J., Anastassiadis, K., Roig, I., Cooke, H.J., Stewart, A.F., Wassmann, K., Jasin, M., et al. (2011). Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse *HORMAD1*. *Nat. Cell Biol.* 13, 599–610.

- DAWLEY, R. (1989). An introduction to unisexual vertebrates. *Evol. Ecol. Unisexual Vertebr.* 1–18.
- Dawley, R.M. (1992). Clonal hybrids of the common laboratory fish *Fundulus heteroclitus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2485–2488.
- Denis, G.V., McComb, M.E., Faller, D.V., Sinha, A., Romesser, P.B., and Costello, C.E. (2006). Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines. *J. Proteome Res.* 5, 502–511.
- Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., and Villeneuve, A.M. (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94, 387–398.
- Doyen, C.M., Moshkin, Y.M., Chalkley, G.E., Bezstarosti, K., Demmers, J.A.A., Rathke, C., Renkawitz-Pohl, R., and Verrijzer, C.P. (2013). Subunits of the histone chaperone CAF1 also mediate assembly of protamine-based chromatin. *Cell Rep.* 4, 59–65.
- Doyen, C.M., Chalkley, G.E., Voets, O., Bezstarosti, K., Demmers, J.A., Moshkin, Y.M., and Verrijzer, C.P. (2015). A Testis-Specific Chaperone and the Chromatin Remodeler ISWI Mediate Repackaging of the Paternal Genome. *Cell Rep.* 13, 1310–1318.
- Drané, P., Ouarrhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* 24, 1253–1265.
- D’Souza, T.G., and Michiels, N.K. (2009). Sex in Parthenogenetic Planarians: Phylogenetic Relic or Evolutionary Resurrection? In *Lost Sex*, (Springer, Dordrecht), pp. 377–397.
- Eggers, S., and Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 20, 215–238.
- Eirín-López, J.M., Frehlick, L.J., and Ausió, J. (2006). Protamines, in the Footsteps of Linker Histone Evolution. *J. Biol. Chem.* 281, 1–4.
- Elliott, J.K., and Mariscal, R.N. (2001). Coexistence of nine anemonefish species: differential host and habitat utilization, size and recruitment. *Mar. Biol.* 138, 23–36.
- Felsenstein, J. (1974). The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78, 737–756.
- Ferrandiz, N., Barroso, C., Telecan, O., Shao, N., Kim, H.-M., Testori, S., Faull, P., Cutillas, P., Snijders, A.P., Colaiácovo, M.P., et al. (2018). Spatiotemporal regulation of Aurora B recruitment ensures release of cohesion during *C. elegans* oocyte meiosis. *Nat. Commun.* 9.
- Finn, R.M., Ellard, K., Eirín-López, J.M., and Ausió, J. (2012). Vertebrate nucleoplasm and NASP: egg histone storage proteins with multiple chaperone activities. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 4788–4804.
- Flot, J.-F., Hespels, B., Li, X., Noel, B., Arkhipova, I., Danchin, E.G.J., Hejnol, A., Henrissat, B., Koszul, R., Aury, J.-M., et al. (2013). Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*. *Nature* 500, 453–457.

- Fournier, D., Estoup, A., Orivel, J., Foucaud, J., Jourdan, H., Le Breton, J., and Keller, L. (2005). Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature* 435, 1230–1234.
- Fox, P.M., Vought, V.E., Hanazawa, M., Lee, M.-H., Maine, E.M., and Schedl, T. (2011). Cyclin E and CDK-2 regulate proliferative cell fate and cell cycle progression in the *C. elegans* germline. *Dev. Camb. Engl.* 138, 2223–2234.
- Frehlick, L.J., Eirín-López, J.M., Jeffery, E.D., Hunt, D.F., and Ausió, J. (2006). The characterization of amphibian nucleoplasmins yields new insight into their role in sperm chromatin remodeling. *BMC Genomics* 7, 99.
- Fricke, H., and Fricke, S. (1977). Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. *Nature* 266, 830–832.
- Fromental-Ramain, C., Ramain, P., and Hamiche, A. (2017). The *Drosophila* DAXX-Like Protein (DLP) Cooperates with ASF1 for H3.3 Deposition and Heterochromatin Formation. *Mol. Cell. Biol.* 37, e00597-16.
- Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., Omata, S., McConnell, M., Fisher, P.A., and Nishida, Y. (2003). Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 116, 3811–3823.
- Galy, V., Mattaj, I.W., and Askjaer, P. (2003). *Caenorhabditis elegans* Nucleoporins Nup93 and Nup205 Determine the Limit of Nuclear Pore Complex Size Exclusion In Vivo. *Mol. Biol. Cell* 14, 5104–5115.
- Gamble, T., and Zarkower, D. (2012). Sex determination. *Curr. Biol.* 22, R257–R262.
- Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Schmid, C.W., and Bradbury, E.M. (1990). Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J. Biol. Chem.* 265, 20662–20666.
- Germano, D.J., and Smith, P.T. (2010). Molecular Evidence for Parthenogenesis in the Sierra Garter Snake, *Thamnophis couchii* (Colubridae). *Southwest. Nat.* 55, 280–282.
- Gilbert, S.F. (2000). Chromosomal Sex Determination in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 6th Ed.
- Giroux, C.N., Dresser, M.E., and Tiano, H.F. (1989). Genetic control of chromosome synapsis in yeast meiosis. *Genome* 31, 88–94.
- Godwin, J. (1994). Historical aspects of protandrous sex change in the anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *J. Zool.* 232, 199–213.
- Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., et al. (2010a). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 140, 678–691.
- Goldberg, E.E., Kohn, J.R., Lande, R., Robertson, K.A., Smith, S.A., and Igić, B. (2010b). Species selection maintains self-incompatibility. *Science* 330, 493–495.

- Goldstein, P. (1982). The synaptonemal complexes of *Caenorhabditis elegans*: pachytene karyotype analysis of male and hermaphrodite wild-type and him mutants. *Chromosoma* 86, 577–593.
- González-Sánchez, M., González-González, E., Molina, F., Chiavarino, A.M., Rosato, M., and Puertas, M.J. (2003). One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene(s) determines their meiotic loss. *Heredity* 90, 122–129.
- Goodyer, W., Kaitna, S., Couteau, F., Ward, J.D., Boulton, S.J., and Zetka, M. (2008). HTP-3 links DSB formation with homolog pairing and crossing over during *C. elegans* meiosis. *Dev. Cell* 14, 263–274.
- Gorjánác, M., Jaedicke, A., and Mattaj, I.W. (2007a). What can *Caenorhabditis elegans* tell us about the nuclear envelope? *FEBS Lett.* 581, 2794–2801.
- Gorjánác, M., Klerkx, E.P.F., Galy, V., Santarella, R., López-Iglesias, C., Askjaer, P., and Mattaj, I.W. (2007b). *Caenorhabditis elegans* BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *EMBO J.* 26, 132–143.
- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Werren, J.H., and Karr, T.L. (2002). Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Invertebr. Pathol.* 81, 166–174.
- Govin, J., Caron, C., Escoffier, E., Ferro, M., Kuhn, L., Rousseaux, S., Eddy, E.M., Garin, J., and Khochbin, S. (2006). Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 281, 37888–37892.
- Grebelnyi, S.D. (2009). Unisexual reproduction: Either maternal or paternal inheritance. (Report) (Springer).
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., and Pelletier, G. (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* 20, 589–600.
- Grimes, S.R., and Henderson, N. (1984). Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Exp. Cell Res.* 152, 91–97.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K., and Wilson, K.L. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 21–31.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., and Chang, C.-F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 352–366.
- Hagstrom, K.A., and Meyer, B.J. (2003). Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nat. Rev. Genet.* 4, 520–534.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.

Harper, N.C., Rillo, R., Jover-Gil, S., Assaf, Z.J., Bhalla, N., and Dernburg, A.F. (2011). Pairing centers recruit a Polo-like kinase to orchestrate meiotic chromosome dynamics in *C. elegans*. *Dev. Cell* 21, 934–947.

Hartfield, M., and Keightley, P.D. (2012). Current hypotheses for the evolution of sex and recombination. *Integr. Zool.* 7, 192–209.

Hattori, A. Social and mating systems of the protandrous anemonefish *Amphiprion perideraion* under the influence of a larger congener. *Austral Ecol.* 25, 187–192.

Haushalter, K.A., and Kadonaga, J.T. (2003). Chromatin assembly by DNA-translocating motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 613–620.

Hayashi, M., Chin, G.M., and Villeneuve, A.M. (2007). *C. elegans* germ cells switch between distinct modes of double-strand break repair during meiotic prophase progression. *PLoS Genet.* 3, e191.

Hebert, P.D.N. (1987). Genotypic characteristics of cyclic parthenogens and their obligately asexual derivatives. In *The Evolution of Sex and Its Consequences*, (Birkhäuser, Basel), pp. 175–195.

Hebert, P.D.N., Ward, R.D., and Weider, L.J. (1988). CLONAL-DIVERSITY PATTERNS AND BREEDING-SYSTEM VARIATION IN *DAPHNIA PULEX*, AN ASEXUAL-SEXUAL COMPLEX. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 42, 147–159.

Heidaran, M.A., and Kistler, W.S. (1987). Isolation of a cDNA clone for transition protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *Gene* 54, 281–284.

Hill, D.P., Shakes, D.C., Ward, S., and Strome, S. (1989). A sperm-supplied product essential for initiation of normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* is encoded by the paternal-effect embryonic-lethal gene, *spe-11*. *Dev. Biol.* 136, 154–166.

Hillers, K.J., and Villeneuve, A.M. (2003). Chromosome-wide control of meiotic crossing over in *C. elegans*. *Curr. Biol. CB* 13, 1641–1647.

Hiruta, C., Nishida, C., and Tochinai, S. (2010). Abortive meiosis in the oogenesis of parthenogenetic *Daphnia pulex*. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 18, 833–840.

Hodgkin, J., and Doniach, T. (1997). Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 146, 149–164.

Hörandl (2013). Meiosis and the Paradox of Sex in Nature | IntechOpen.

Hörandl, E., and Hadacek, F. (2013). The oxidative damage initiation hypothesis for meiosis. *Plant Reprod.* 26, 351–367.

Horard, B., and Loppin, B. (2015). Histone storage and deposition in the early *Drosophila* embryo. *Chromosoma* 124, 163–175.

Horard, B., Sapey-Triomphe, L., Bonnefoy, E., and Loppin, B. (2018). ASF1 is required to load histones on the HIRA complex in preparation of paternal chromatin assembly at fertilization. *Epigenetics Chromatin* 11, 19.



- Incharoensakdi, A., and Panyim, S. (1981). In vitro decondensation of human sperm chromatin. *Andrologia* 13, 64–73.
- Ishibashi, R., Ookubo, K., Aoki, M., Utaki, M., Komaru, A., and Kawamura, K. (2003). Androgenetic reproduction in a freshwater diploid clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Zoolog. Sci.* 20, 727–732.
- Ishimi, Y., Hirosumi, J., Sato, W., Sugasawa, K., Yokota, S., Hanaoka, F., and Yamada, M. (1984). Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 142, 431–439.
- Italiano, J.E., Stewart, M., and Roberts, T.M. (2001). How the assembly dynamics of the nematode major sperm protein generate amoeboid cell motility. *Int. Rev. Cytol.* 202, 1–34.
- Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (1996). *Drosophila* NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3112–3124.
- Jaenike, J. (1978). An hypothesis to account for the maintenance of sex within populations. *Evol Theory* 191–194.
- Janzen, F.J., and Paukstis, G.L. (1991). Environmental Sex Determination in Reptiles: Ecology, Evolution, and Experimental Design. *Q. Rev. Biol.* 66, 149–179.
- Jaramillo-Lambert, A., Ellefson, M., Villeneuve, A.M., and Engebrecht, J. (2007). Differential timing of S phases, X chromosome replication, and meiotic prophase in the *C. elegans* germ line. *Dev. Biol.* 308, 206–221.
- Jayaramaiah Raja, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2005). Replacement by *Drosophila* melanogaster protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6165–6177.
- Jiang, J., Bende, C., Haoxiang, Y., Shixing, S., Sui, Y.D.L., and Genquan, S. (1983). Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic offspring in *Carassius auratus gibelio*. *Acta Hydrobiol Sin* 1–13.
- Jones (2008). A century of B chromosomes in plants: so what? - Semantic Scholar. *Ann. Bot.* 767–775.
- Kaitna, S., Pasierbek, P., Jantsch, M., Loidl, J., and Glotzer, M. (2002). The aurora B kinase AIR-2 regulates kinetochores during mitosis and is required for separation of homologous Chromosomes during meiosis. *Curr. Biol. CB* 12, 798–812.
- Keeney, S. (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52, 1–53.
- Kelly, K.O., Dernburg, A.F., Stanfield, G.M., and Villeneuve, A.M. (2000). *Caenorhabditis elegans* msh-5 is required for both normal and radiation-induced meiotic crossing over but not for completion of meiosis. *Genetics* 156, 617–630.
- Kimura, Y., and Yanagimachi, R. (1995). Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Dev. Camb. Engl.* 121, 2397–2405.

- King, C.E., Ricci, C., Schonfeld, J., and Serra, M. (2005). Evolutionary Dynamics of 'the' Bdelloid and Monogonont Rotifer Life-history Patterns. *Hydrobiologia* 546, 55–70.
- Kleene, K.C. (2003). Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 217–224.
- Kleene, K.C., and Flynn, J.F. (1987). Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse. *J. Biol. Chem.* 262, 17272–17277.
- Kleene, K.C., Borzorgzadeh, A., Flynn, J.F., Yelick, P.C., and Hecht, N.B. (1988). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding mouse transition protein 1. *Biochim. Biophys. Acta* 950, 215–220.
- Kleinschmidt, J.A., Fortkamp, E., Krohne, G., Zentgraf, H., and Franke, W.W. (1985). Co-existence of two different types of soluble histone complexes in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 260, 1166–1176.
- Kobayashi, Y., Nagahama, Y., and Nakamura, M. (2013). Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 7, 115–125.
- Kokko, H., and Heubel, K.U. (2011). Prudent males, group adaptation, and the tragedy of the commons. *Oikos* 120, 641–656.
- Komaru, A., Ookubo, K., and Kiyomoto, M. (2000). All meiotic chromosomes and both centrosomes at spindle pole in the zygotes discarded as two polar bodies in clam *Corbicula leana*: unusual polar body formation observed by antitubulin immunofluorescence. *Dev. Genes Evol.* 210, 263–269.
- Kondrashov, A.S. (1988). Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336, 435–440.
- Konev, A.Y., Tribus, M., Park, S.Y., Podhraski, V., Lim, C.Y., Emelyanov, A.V., Vershilova, E., Pirrotta, V., Kadonaga, J.T., Lusser, A., et al. (2007). CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin in vivo. *Science* 317, 1087–1090.
- Kono, T. (2006). Genomic imprinting is a barrier to parthenogenesis in mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 113, 31–35.
- Kouyos, R.D., Silander, O.K., and Bonhoeffer, S. (2007). Epistasis between deleterious mutations and the evolution of recombination. *Trends Ecol. Evol.* 22, 308–315.
- Kowalski, A., and Pałyga, J. (2012). Linker histone subtypes and their allelic variants. *Cell Biol. Int.* 36, 981–996.
- Kurtz, K., Martínez-Soler, F., Ausió, J., and Chiva, M. (2007). Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *J. Cell. Biochem.* 102, 1432–1441.
- Laberge, R.-M., and Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol. Reprod.* 73, 289–296.

- Lada, G.A., Borkin, L.J., and Vinogradov, A.E. (2011). Distribution, Population Systems and Reproductive Behavior of Green Frogs (Hybridogenetic *Rana esculenta* Complex) in the Central Chernozem Territory of Russia. *Russ. J. Herpetol.* 2, 46–57.
- Lamatsch, D.K., and Stöck, M. (2009). Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes. In *Lost Sex : The Evolutionary Biology of Parthenogenesis.*, *Lost Sex : The Evolutionary Biology of Parthenogenesis.*, (Springer), pp. 399–432.
- Lamitina, S.T., and L'Hernault, S.W. (2002). Dominant mutations in the *Caenorhabditis elegans* Myt1 ortholog wee-1.3 reveal a novel domain that controls M-phase entry during spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 129, 5009–5018.
- Lampert, K.P., and Schartl, M. (2008). The origin and evolution of a unisexual hybrid: *Poecilia formosa*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 2901–2909.
- Lassy, C.W., and Karr, T.L. (1996). Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mech. Dev.* 57, 47–58.
- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., and Yamashita, M. (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *J. Cell Sci.* 116, 2781–2790.
- Lee, K.K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J., and Wilson, K.L. (2000). *C. elegans* nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 11, 3089–3099.
- Lehtonen, J., Schmidt, D.J., Heubel, K., and Kokko, H. (2013). Evolutionary and ecological implications of sexual parasitism. *Trends Ecol. Evol.* 28, 297–306.
- Lévesque, D., Veilleux, S., Caron, N., and Boissonneault, G. (1998). Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 602–609.
- Lewis, W.M. (1987). The cost of sex. In *The Evolution of Sex and Its Consequences*, (Birkhäuser, Basel), pp. 33–57.
- Lewis, J.D., Song, Y., de Jong, M.E., Bagha, S.M., and Ausió, J. (2003). A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111, 473–482.
- L'Hernault, S.W. (2006). Spermatogenesis (WormBook).
- L'Hernault, S.W., and Singson, A.W. (2000). Developmental Genetics of Spermatogenesis in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. In *The Testis*, (Springer, New York, NY), pp. 109–119.
- Lievens, E.J.P., Henriques, G.J.B., Michalakakis, Y., and Lenormand, T. (2016). Maladaptive Sex Ratio Adjustment in the Invasive Brine Shrimp *Artemia franciscana*. *Curr. Biol. CB* 26, 1463–1467.
- Lightfoot, J., Testori, S., Barroso, C., and Martinez-Perez, E. (2011). Loading of meiotic cohesin by SCC-2 is required for early processing of DSBs and for the DNA damage checkpoint. *Curr. Biol. CB* 21, 1421–1430.

Lin, F., Blake, D.L., Callebaut, I., Skerjanc, I.S., Holmer, L., McBurney, M.W., Paulin-Levasseur, M., and Worman, H.J. (2000). MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J. Biol. Chem.* 275, 4840–4847.

Lindholm, A.K., Dyer, K.A., Firman, R.C., Fishman, L., Forstmeier, W., Holman, L., Johannesson, H., Knief, U., Kokko, H., Larracuenta, A.M., et al. (2016). The Ecology and Evolutionary Dynamics of Meiotic Drive. *Trends Ecol. Evol.* 31, 315–326.

Liu, W.-M., Pang, R.T.K., Chiu, P.C.N., Wong, B.P.C., Lao, K., Lee, K.-F., and Yeung, W.S.B. (2012). Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 490–494.

Lloyd, D.G. (1979). Some Reproductive Factors Affecting the Selection of Self-Fertilization in Plants. *Am. Nat.* 113, 67–79.

Loewe, L., and Lamatsch, D.K. (2008). Quantifying the threat of extinction from Muller's ratchet in the diploid Amazon molly (*Poecilia formosa*). *BMC Evol. Biol.* 8, 88.

Loidl, J. (1990). The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* 33, 759–778.

Loppin, B., Berger, F., and Couble, P. (2001). The *Drosophila* maternal gene *sésame* is required for sperm chromatin remodeling at fertilization. *Chromosoma* 110, 430–440.

Loyola, A., and Almouzni, G. (2004). Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim. Biophys. Acta* 1677, 3–11.

Lu, L.-Y., Wu, J., Ye, L., Gavrulina, G.B., Saunders, T.L., and Yu, X. (2010). RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev. Cell* 18, 371–384.

Lung, O., Tram, U., Finnerty, C.M., Eipper-Mains, M.A., Kalb, J.M., and Wolfner, M.F. (2002). The *Drosophila melanogaster* seminal fluid protein Acp62F is a protease inhibitor that is toxic upon ectopic expression. *Genetics* 160, 211–224.

Lutes, A.A., Neaves, W.B., Baumann, D.P., Wiegräbe, W., and Baumann, P. (2010). Sister Chromosome Pairing Maintains Heterozygosity in Parthenogenetic Lizards. *Nature* 464, 283–286.

Ma, X., Zhu, Y., Li, C., Xue, P., Zhao, Y., Chen, S., Yang, F., and Miao, L. (2014). Characterisation of *Caenorhabditis elegans* sperm transcriptome and proteome. *BMC Genomics* 15, 168.

MacQueen, A.J., Colaiácovo, M.P., McDonald, K., and Villeneuve, A.M. (2002). Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev.* 16, 2428–2442.

MacQueen, A.J., Phillips, C.M., Bhalla, N., Weiser, P., Villeneuve, A.M., and Dernburg, A.F. (2005). Chromosome sites play dual roles to establish homologous synapsis during meiosis in *C. elegans*. *Cell* 123, 1037–1050.

- Maller, J., Poccia, D., Nishioka, D., Kidd, P., Gerhart, J., and Hartman, H. (1976). Spindle formation and cleavage in *Xenopus* eggs injected with centriole-containing fractions from sperm. *Exp. Cell Res.* 99, 285–294.
- Manandhar, G., Schatten, H., and Sutovsky, P. (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol. Reprod.* 72, 2–13.
- Mantovani, B., and Scali, V. (1992). HYBRIDOGENESIS AND ANDROGENESIS IN THE STICK-INSECT *BACILLUS ROSSIUS-GRANDII* BENAZZII (INSECTA, PHASMATODEA). *Evol. Int. J. Org. Evol.* 46, 783–796.
- Marcon, L., and Boissonneault, G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol. Reprod.* 70, 910–918.
- Marescalchi, O., Zauli, C., and Scali, V. (2002). Centrosome dynamics and inheritance in related sexual and parthenogenetic *Bacillus* (Insecta Phasmatodea). *Mol. Reprod. Dev.* 63, 89–95.
- Marshall, W.F. (2001). Centrioles take center stage. *Curr. Biol.* CB 11, R487-496.
- Martinez-Perez, E., and Villeneuve, A.M. (2005). HTP-1-dependent constraints coordinate homolog pairing and synapsis and promote chiasma formation during *C. elegans* meiosis. *Genes Dev.* 19, 2727–2743.
- Martinez-Perez, E., Schvarzstein, M., Barroso, C., Lightfoot, J., Dernburg, A.F., and Villeneuve, A.M. (2008). Crossovers trigger a remodeling of meiotic chromosome axis composition that is linked to two-step loss of sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 22, 2886–2901.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Kikuchi, A., and Tsujimoto, M. (1999). Sperm Chromatin Decondensation by Template Activating Factor I through Direct Interaction with Basic Proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6940–6952.
- Maynard Smith, J. (1971). The origin and maintenance of sex. *Group Sel.* 163–175.
- Maynard Smith, J. (1978). *The Evolution of Sex* (CUP Archive).
- McKim, K.S., Howell, A.M., and Rose, A.M. (1988). The effects of translocations on recombination frequency in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 120, 987–1001.
- McKim, K.S., Green-Marroquin, B.L., Sekelsky, J.J., Chin, G., Steinberg, C., Khodosh, R., and Hawley, R.S. (1998). Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279, 876–878.
- McKone, M.J., and Halpern, S.L. (2003). The evolution of androgenesis. *Am. Nat.* 161, 641–656.
- McLay, D.W., and Clarke, H.J. (2003). Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reprod. Camb. Engl.* 125, 625–633.

- McNutt, J.W., and Silk, J.B. (2008). Pup production, sex ratios, and survivorship in African wild dogs, *Lycaon pictus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 1061–1067.
- McPherson, S., and Longo, F.J. (1993). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur. J. Histochem. EJH* 37, 109–128.
- Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., and Zhao, M. (2003a). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483–488.
- Meistrich, M.L., Wilson, G., Porter, K.L., Huhtaniemi, I., Shetty, G., and Shuttlesworth, G.A. (2003b). Restoration of spermatogenesis in dibromochloropropane (DBCP)-treated rats by hormone suppression. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 76, 418–426.
- Mets, D.G., and Meyer, B.J. (2009). Condensins regulate meiotic DNA break distribution, thus crossover frequency, by controlling chromosome structure. *Cell* 139, 73–86.
- Meyerzon, M., Gao, Z., Liu, J., Wu, J.-C., Malone, C.J., and Starr, D.A. (2009). Centrosome attachment to the *C. elegans* male pronucleus is dependent on the surface area of the nuclear envelope. *Dev. Biol.* 327, 433–446.
- Miersch, C., and Döring, F. (2012). Paternal dietary restriction affects progeny fat content in *Caenorhabditis elegans*. *IUBMB Life* 64, 644–648.
- Miller, D. (2007). Ensuring continuity of the paternal genome: potential roles for spermatozoal RNA in mammalian embryogenesis. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 373–389.
- Miller, D., and Ostermeier, G.C. (2006). Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum. Reprod. Update* 12, 757–767.
- Miller, D., Brinkworth, M., and Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139, 287–301.
- Mirzaghaderi, G., and Hörandl, E. (2016). The evolution of meiotic sex and its alternatives. *Proc R Soc B* 283, 20161221.
- Moran, N.A. (1992). The Evolution of Aphid Life Cycles. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 321–348.
- Morinière, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-López, M., Curtet, S., Vitte, A.-L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., et al. (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461, 664–668.
- Muller, H.J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1, 2–9.
- Nabeshima, K., Villeneuve, A.M., and Colaiácovo, M.P. (2005). Crossing over is coupled to late meiotic prophase bivalent differentiation through asymmetric disassembly of the SC. *J. Cell Biol.* 168, 683–689.
- Nag, D.K., Scherthan, H., Rockmill, B., Bhargava, J., and Roeder, G.S. (1995). Heteroduplex DNA formation and homolog pairing in yeast meiotic mutants. *Genetics* 141, 75–86.

- Nakamura, M., Miura, S., Nozu, R., and Kobayashi, Y. (2015). Opposite-directional sex change in functional female protandrous anemonefish, *Amphiprion clarkii*: effect of aromatase inhibitor on the ovarian tissue. *Zool. Lett.* 1.
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Croce, L.D., and Piferrer, F. (2011). DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (*cyp19a*) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. *PLOS Genet.* 7, e1002447.
- Neaves, W.B., and Baumann, P. (2011). Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends Genet. TIG* 27, 81–88.
- Ng, S.-F., Lin, R.C.Y., Laybutt, D.R., Barres, R., Owens, J.A., and Morris, M.J. (2010). Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467, 963–966.
- Niemeitz, A., Kreutzfeldt, R., Scharl, M., Parzefall, J., and Schlupp, I. (2002). Male mating behaviour of a molly, *Poecilia latipunctata*: A third host for the sperm-dependent Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Acta Ethologica* 5, 45–49.
- Nishimura, H., and L'Hernault, S.W. (2010). Spermatogenesis-defective (*spe*) Mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans* Provide Clues to Solve the Puzzle of Male Germline Functions during Reproduction. *Dev. Dyn.* 239, 1502–1514.
- Nougué, O., Rode, N.O., Jabbour-Zahab, R., Ségard, A., Chevin, L.-M., Haag, C.R., and Lenormand, T. (2015). Automixis in *Artemia*: solving a century-old controversy. *J. Evol. Biol.* 28, 2337–2348.
- Ono, M., and Harley, V.R. (2013). Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 79–91.
- Ooi, S.L., Priess, J.R., and Henikoff, S. (2006). Histone H3.3 Variant Dynamics in the Germline of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 2.
- Orsi, G.A., Couble, P., and Loppin, B. (2009). Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 231–243.
- Orsi, G.A., Algazeery, A., Meyer, R.E., Capri, M., Sapey-Triomphe, L.M., Horard, B., Gruffat, H., Couble, P., Aït-Ahmed, O., and Loppin, B. (2013). *Drosophila* Yemanuclein and HIRA Cooperate for De Novo Assembly of H3.3-Containing Nucleosomes in the Male Pronucleus. *PLOS Genet.* 9, e1003285.
- Ospina-Álvarez, N., and Piferrer, F. (2008). Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLOS ONE* 3, e2837.
- Palestis, B.G., Trivers, R., Burt, A., and Jones, R.N. (2004). The distribution of B chromosomes across species. *Cytogenet. Genome Res.* 106, 151–158.
- Palmer, D.K., O'Day, K., and Margolis, R.L. (1990). The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* 100, 32–36.

- Parisi, S., McKay, M.J., Molnar, M., Thompson, M.A., van der Spek, P.J., van Drunen-Schoenmaker, E., Kanaar, R., Lehmann, E., Hoeijmakers, J.H., and Kohli, J. (1999). Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3515–3528.
- Pasierbek, P., Jantsch, M., Melcher, M., Schleiffer, A., Schweizer, D., and Loidl, J. (2001). A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev.* 15, 1349–1360.
- Pasierbek, P., Födermayr, M., Jantsch, V., Jantsch, M., Schweizer, D., and Loidl, J. (2003). The *Caenorhabditis elegans* SCC-3 homologue is required for meiotic synapsis and for proper chromosome disjunction in mitosis and meiosis. *Exp. Cell Res.* 289, 245–255.
- Pélabon, C., Borg, Å.A., Bjelvenmark, J., Forsgren, E., Barber, I., and Amundsen, T. (2003). Do male two-spotted gobies prefer large fecund females? *Behav. Ecol.* 14, 787–792.
- Penkner, A., Portik-Dobos, Z., Tang, L., Schnabel, R., Novatchkova, M., Jantsch, V., and Loidl, J. (2007). A conserved function for a *Caenorhabditis elegans* Com1/Sae2/CtIP protein homolog in meiotic recombination. *EMBO J.* 26, 5071–5082.
- Penkner, A.M., Fridkin, A., Gloggnitzer, J., Baudrimont, A., Machacek, T., Woglar, A., Csaszar, E., Pasierbek, P., Ammerer, G., Gruenbaum, Y., et al. (2009). Meiotic chromosome homology search involves modifications of the nuclear envelope protein Matefin/SUN-1. *Cell* 139, 920–933.
- Peoples, T.L., Dean, E., Gonzalez, O., Lambourne, L., and Burgess, S.M. (2002). Close, stable homolog juxtaposition during meiosis in budding yeast is dependent on meiotic recombination, occurs independently of synapsis, and is distinct from DSB-independent pairing contacts. *Genes Dev.* 16, 1682–1695.
- Peoples-Holst, T.L., and Burgess, S.M. (2005). Multiple branches of the meiotic recombination pathway contribute independently to homolog pairing and stable juxtaposition during meiosis in budding yeast. *Genes Dev.* 19, 863–874.
- Pereira, R. a. S., and Prado, A.P. (2006). Effect of local mate competition on fig wasp sex ratios. *Braz. J. Biol. Rev. Brasleira Biol.* 66, 603–610.
- Perotti, M.E. (1975). Ultrastructural aspects of fertilization in *Drosophila*. *Int. Symp. Funct. Anat. Spermatozoon.*
- Perreault, S.D., Wolff, R.A., and Zirkin, B.R. (1984). The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev. Biol.* 101, 160–167.
- Perreault, S.D., Naish, S.J., and Zirkin, B.R. (1987). The Timing of Hamster Sperm Nuclear Decondensation and Male Pronucleus Formation is Related to Sperm Nuclear Disulfide Bond Content. *Biol. Reprod.* 36, 239–244.
- Perreault, S.D., Barbee, R.R., and Slott, V.L. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 125, 181–186.



- Phillips, C.M., and Dernburg, A.F. (2006). A family of zinc-finger proteins is required for chromosome-specific pairing and synapsis during meiosis in *C. elegans*. *Dev. Cell* 11, 817–829.
- Phillips, C.M., Wong, C., Bhalla, N., Carlton, P.M., Weiser, P., Meneely, P.M., and Dernburg, A.F. (2005). HIM-8 binds to the X chromosome pairing center and mediates chromosome-specific meiotic synapsis. *Cell* 123, 1051–1063.
- Phillips, C.M., Meng, X., Zhang, L., Chretien, J.H., Urnov, F.D., and Dernburg, A.F. (2009). Identification of chromosome sequence motifs that mediate meiotic pairing and synapsis in *C. elegans*. *Nat. Cell Biol.* 11, 934–942.
- Philpott, A., Leno, G.H., and Laskey, R.A. (1991). Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell* 65, 569–578.
- Pichot, C., Fady, B., and Hochu, I. (2000). Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camus embryos. *Ann. For. Sci.* 57, 17–22.
- Pichot, C., El Maâtaoui, M., Raddi, S., and Raddi, P. (2001). Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* 412, 39.
- Pigneur, L.-M., Hedtke, S.M., Etoundi, E., and Van Doninck, K. (2012). Androgenesis: a review through the study of the selfish shellfish *Corbicula* spp. *Heredity* 108, 581–591.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5354–5365.
- Politi, Y., Gal, L., Kalifa, Y., Ravid, L., Elazar, Z., and Arama, E. (2014). Paternal mitochondrial destruction after fertilization is mediated by a common endocytic and autophagic pathway in *Drosophila*. *Dev. Cell* 29, 305–320.
- Quinn, A.E., Radder, R.S., Sarre, S.D., Georges, A., Ezaz, T., and Shine, R. (2009). Isolation and development of a molecular sex marker for *Bassiana duperreyi*, a lizard with XX/XY sex chromosomes and temperature-induced sex reversal. *Mol. Genet. Genomics* 281, 665–672.
- Räsänen, K., Laurila, A., and Merilä, J. (2002). Carry-over effects of embryonic acid conditions on development and growth of *Rana temporaria* tadpoles. *Freshw. Biol.* 47, 19–30.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I., and Cuzin, F. (2006). RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441, 469–474.
- Rathke, C., Baarends, W.M., Jayaramaiah-Raja, S., Bartkuhn, M., Renkawitz, R., and Renkawitz-Pohl, R. (2007). Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 120, 1689–1700.
- Rathke, C., Barckmann, B., Burkhard, S., Jayaramaiah-Raja, S., Roote, J., and Renkawitz-Pohl, R. (2010). Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 326–338.

- Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 155–168.
- Raychaudhuri, N., Dubruille, R., Orsi, G.A., Bagheri, H.C., Loppin, B., and Lehner, C.F. (2012). Transgenerational propagation and quantitative maintenance of paternal centromeres depends on Cid/Cenp-A presence in *Drosophila* sperm. *PLoS Biol.* 10, e1001434.
- Ray-Gallet, D., Quivy, J.-P., Scamps, C., Martini, E.M.-D., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell* 9, 1091–1100.
- Rechtsteiner, A., Ercan, S., Takasaki, T., Phippen, T.M., Egelhofer, T.A., Wang, W., Kimura, H., Lieb, J.D., and Strome, S. (2010). The Histone H3K36 Methyltransferase MES-4 Acts Epigenetically to Transmit the Memory of Germline Gene Expression to Progeny. *PLOS Genet.* 6, e1001091.
- Reinsch, S., and Gönczy, P. (1998). Mechanisms of nuclear positioning. *J. Cell Sci.* 111 ( Pt 16), 2283–2295.
- Rhen, T., and Schroeder, A. (2010). Molecular Mechanisms of Sex Determination in Reptiles. *Sex. Dev.* 4, 16–28.
- Rispe, C., Pierre, J.-S., Simon, J.-C., and Gouyon, P.-H. Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints. *J. Evol. Biol.* 11, 685–701.
- Roeder, G.S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* 11, 2600–2621.
- Rogers, E., Bishop, J.D., Waddle, J.A., Schumacher, J.M., and Lin, R. (2002). The aurora kinase AIR-2 functions in the release of chromosome cohesion in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *J. Cell Biol.* 157, 219–229.
- Saito, T.T., Youds, J.L., Boulton, S.J., and Colaiácovo, M.P. (2009). *Caenorhabditis elegans* HIM-18/SLX-4 interacts with SLX-1 and XPF-1 and maintains genomic integrity in the germline by processing recombination intermediates. *PLoS Genet.* 5, e1000735.
- Salathé, M., Kouyos, R.D., and Bonhoeffer, S. (2008). The state of affairs in the kingdom of the Red Queen. *Trends Ecol. Evol.* 23, 439–445.
- Samson, M., Jow, M.M., Wong, C.C.L., Fitzpatrick, C., Aslanian, A., Saucedo, I., Estrada, R., Ito, T., Park, S.R., Iij, J.R.Y., et al. (2014). The Specification and Global Reprogramming of Histone Epigenetic Marks during Gamete Formation and Early Embryo Development in *C. elegans*. *PLOS Genet.* 10, e1004588.
- Sanford, C., and Perry, M.D. (2001). Asymmetrically distributed oligonucleotide repeats in the *Caenorhabditis elegans* genome sequence that map to regions important for meiotic chromosome segregation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2920–2926.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176–2178.

- Schatten, H., Schatten, G., Mazia, D., Balczon, R., and Simerly, C. (1986). Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 105–109.
- Schlecht, H.B., Lichten, M., and Goldman, A.S.H. (2004). Compartmentalization of the yeast meiotic nucleus revealed by analysis of ectopic recombination. *Genetics* 168, 1189–1203.
- Schlupp, I. (2005). The Evolutionary Ecology of Gynogenesis. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 399–417.
- Schlupp, I. (2010). Mate Choice and the Amazon Molly: How Sexuality and Unisexuality Can Coexist. *J. Hered.* 101, S55–S61.
- Schlupp, I., Parzefall, J., and Scharl, M. (1991). Male Mate Choice in Mixed Bisexual/Unisexual Breeding Complexes of *Poecilia* (Teleostei: Poeciliidae). *Ethology* 88, 215–222.
- Schlupp, I., Marler, C., and Ryan, M.J. (1994). Benefit to male sailfin mollies of mating with heterospecific females. *Science* 263, 373–374.
- Schlupp, I., Nanda, I., Döbler, M., Lamatsch, D.K., Epplen, J.T., Parzefall, J., Schmid, M., and Scharl, M. (1998). Dispensable and indispensable genes in an ameiotic fish, the Amazon molly *Poecilia formosa*. *Cytogenet. Cell Genet.* 80, 193–198.
- Schlupp, I., Parzefall, J., and Scharl, M. (2002). Biogeography of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *J. Biogeogr.* 29, 1–6.
- Schmeller, D.. (2005). Male adaptive stupidity: male mating pattern in hybridogenetic frogs. *Evol. Ecol. Res.* 1039–1050.
- Schmidt, D.J., Bond, N.R., Adams, M., and Hughes, J.M. (2011). Cytonuclear evidence for hybridogenetic reproduction in natural populations of the Australian carp gudgeon (*Hypseleotris: Eleotridae*). *Mol. Ecol.* 20, 3367–3380.
- Schwander, T., and Crespi, B.J. (2009). Twigs on the tree of life? Neutral and selective models for integrating macroevolutionary patterns with microevolutionary processes in the analysis of asexuality. *Mol. Ecol.* 18, 28–42.
- Schwander, T., and Oldroyd, B.P. (2016). Androgenesis: where males hijack eggs to clone themselves. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 371.
- Schwartz, E.K., and Heyer, W.-D. (2011). Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* 120, 109–127.
- Segura-Totten, M., Kowalski, A.K., Craigie, R., and Wilson, K.L. (2002). Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J. Cell Biol.* 158, 475–485.
- Seitan, V.C., Banks, P., Laval, S., Majid, N.A., Dorsett, D., Rana, A., Smith, J., Bateman, A., Krpic, S., Hostert, A., et al. (2006). Metazoan *Scc4* homologs link sister chromatid cohesion to cell and axon migration guidance. *PLoS Biol.* 4, e242.

- Severson, A.F., Ling, L., van Zuylen, V., and Meyer, B.J. (2009). The axial element protein HTP-3 promotes cohesin loading and meiotic axis assembly in *C. elegans* to implement the meiotic program of chromosome segregation. *Genes Dev.* 23, 1763–1778.
- Shakes, D.C., Neva, B.J., Huynh, H., Chaudhuri, J., and Pires-daSilva, A. (2011). Asymmetric spermatocyte division as a mechanism for controlling sex ratios. *Nat. Commun.* 2, 157.
- Sherwood, R., Takahashi, T.S., and Jallepalli, P.V. (2010). Sister acts: coordinating DNA replication and cohesion establishment. *Genes Dev.* 24, 2723–2731.
- Shibahara, K., and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 96, 575–585.
- Shine, R., Branch, W.R., Harlow, P.S., and Webb, J.K. (1996). Sexual dimorphism, reproductive biology, and food habits of two species of African filesnakes (*Mehelya*, Colubridae). *J. Zool.* 240, 327–340.
- Shintomi, K., Iwabuchi, M., Saeki, H., Ura, K., Kishimoto, T., and Ohsumi, K. (2005). Nucleosome assembly protein-1 is a linker histone chaperone in *Xenopus* eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8210–8215.
- Simon, J.-C., Delmotte, F., Rispe, C., and Crease, T. (2003). Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biol. J. Linn. Soc.* 79, 151–163.
- Smolikov, S., Eizinger, A., Schild-Prufert, K., Hurlburt, A., McDonald, K., Engebrecht, J., Villeneuve, A.M., and Colaiácovo, M.P. (2007a). SYP-3 restricts synaptonemal complex assembly to bridge paired chromosome axes during meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176, 2015–2025.
- Smolikov, S., Eizinger, A., Hurlburt, A., Rogers, E., Villeneuve, A.M., and Colaiácovo, M.P. (2007b). Synapsis-defective mutants reveal a correlation between chromosome conformation and the mode of double-strand break repair during *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genetics* 176, 2027–2033.
- Smolikov, S., Schild-Prüfert, K., and Colaiácovo, M.P. (2008). CRA-1 uncovers a double-strand break-dependent pathway promoting the assembly of central region proteins on chromosome axes during *C. elegans* meiosis. *PLoS Genet.* 4, e1000088.
- Smolikov, S., Schild-Prüfert, K., and Colaiácovo, M.P. (2009). A yeast two-hybrid screen for SYP-3 interactors identifies SYP-4, a component required for synaptonemal complex assembly and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *PLoS Genet.* 5, e1000669.
- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M., and Fishel, R. (2004). hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol. Cell* 15, 437–451.
- Starr, D.A., and Han, M. (2003). ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J. Cell Sci.* 116, 211–216.
- Steger, K. (1999). Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat. Embryol. (Berl.)* 199, 471–487.

- Stoeckius, M., Grün, D., and Rajewsky, N. (2014). Paternal RNA contributions in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *EMBO J.* 33, 1740–1750.
- Stricker, S.A. (1999). Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol.* 211, 157–176.
- Strome, S., Kelly, W.G., Ercan, S., and Lieb, J.D. (2014). Regulation of the X Chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Sulston, J.E., Albertson, D.G., and Thomson, J.N. (1980). The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures. *Dev. Biol.* 78, 542–576.
- Sun, H., Treco, D., and Szostak, J.W. (1991). Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell* 64, 1155–1161.
- Surani, M.A., and Barton, S.C. (1983). Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222, 1034–1036.
- Sutovsky, P., and Schatten, G. (1997). Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol. Reprod.* 56, 1503–1512.
- Svendsen, N., Reisser, C.M.O., Dukić, M., Thuillier, V., Ségard, A., Liautard-Haag, C., Fasel, D., Hürlimann, E., Lenormand, T., Galimov, Y., et al. (2015). Uncovering Cryptic Asexuality in *Daphnia magna* by RAD Sequencing. *Genetics* 201, 1143–1155.
- Swim, M.M., Kaeding, K.E., and Ferree, P.M. (2012). Impact of a selfish B chromosome on chromatin dynamics and nuclear organization in *Nasonia*. *J. Cell Sci.* 125, 5241–5249.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.* 21, 421–434.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51–61.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 264–275.
- Tanphaichitr, N., Sobhon, P., Taluppeth, N., and Chalermisarachai, P. (1978). Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell Res.* 117, 347–356.
- Tinti, F., and Scali, V. (1996). ANDROGENETICS AND TRIPLOIDS FROM AN INTERACTING PARTHENOGENETIC HYBRID AND ITS ANCESTORS IN STICK INSECTS. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 50, 1251–1258.
- Tirmarche, S., Kimura, S., Dubruille, R., Horard, B., and Loppin, B. (2016). Unlocking sperm chromatin at fertilization requires a dedicated egg thioredoxin in *Drosophila*. *Nat. Commun.* 7, 13539.
- Tram, U., and Sullivan, W. (2002). Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296, 1124–1126.

- Turner, J.M.A., Mahadevaiah, S.K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C.-X., and Burgoyne, P.S. (2005). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat. Genet.* 37, 41–47.
- Unni, E., Mayerhofer, A., Zhang, Y., Bhatnagar, Y.M., Russell, L.D., and Meistrich, M.L. (1995). Increased accessibility of the N-terminus of testis-specific histone TH2B to antibodies in elongating spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 210–219.
- Vandekerckhove, T., Watteyne, S., Bonne, W., Vanacker, D., Devaere, S., Rumes, B., Maelfait, J.-P., Gillis, M., Swings, J., Braig, H., et al. (2003). Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (alpha-Proteobacteria). *Belg. J. Zool.* 133, 61–69.
- Verhulst, E.C., Lynch, J.A., Bopp, D., Beukeboom, L.W., and Zande, L. van de (2013). A New Component of the *Nasonia* Sex Determining Cascade Is Maternally Silenced and Regulates Transformer Expression. *PLOS ONE* 8, e63618.
- Villeneuve, A.M. (1994). A cis-acting locus that promotes crossing over between X chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 136, 887–902.
- Voon, H.P.J., and Wong, L.H. (2016). New players in heterochromatin silencing: histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. *Nucleic Acids Res.* 44, 1496–1501.
- Vorburger, C., Schmeller, D.S., Hotz, H., Guex, G.-D., and Reyer, H.-U. (2009). Masked Damage: Mutational Load in Hemiclonal Water Frogs. In *Lost Sex*, (Springer, Dordrecht), pp. 433–446.
- Vrijenhoek, R., Dawley, R., Cole, C.J., and Bogart, J. (1989). A list of known unisexual vertebrates.
- Walker, G. (2005). Sex determination in the larvae of the parasitic barnacle *Heterosaccus lunatus*: an experimental approach. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 31–38.
- Wang, F., Yoder, J., Antoshechkin, I., and Han, M. (2003). *Caenorhabditis elegans* EVL-14/PDS-5 and SCC-3 are essential for sister chromatid cohesion in meiosis and mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7698–7707.
- Ward, S., and Carrel, J.S. (1979). Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 73, 304–321.
- Ward, S., and Klass, M. (1982). The location of the major protein in *Caenorhabditis elegans* sperm and spermatocytes. *Dev. Biol.* 92, 203–208.
- Warner, R.R., Fitch, D.L., and Standish, J.D. (1996). Social control of sex change in the shelf limpet, *Crepidula norrisiarum*: size-specific responses to local group composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 204, 155–167.
- Weeks, A.R., and Breeuwer, J.A. (2001). *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 268, 2245–2251.
- Werren, J.H., Zhang, W., and Guo, L.R. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. Biol. Sci.* 261, 55–63.

- Werren, J.H., Baldo, L., and Clark, M.E. (2008). Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741–751.
- van Wilgenburg, E., Driessen, G., and Beukeboom, L.W. (2006). Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an “unintelligent” design? *Front. Zool.* 3, 1.
- Wilhelmsen, K., Ketema, M., Truong, H., and Sonnenberg, A. (2006). KASH-domain proteins in nuclear migration, anchorage and other processes. *J. Cell Sci.* 119, 5021–5029.
- Wilson, K.L., Fitch, K.R., Bafus, B.T., and Wakimoto, B.T. (2006). Sperm plasma membrane breakdown during *Drosophila* fertilization requires Sneaky, an acrosomal membrane protein. *Development* 133, 4871–4879.
- Winand, N.J., Panzer, J.A., and Kolodner, R.D. (1998). Cloning and characterization of the human and *Caenorhabditis elegans* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics* 53, 69–80.
- Wood, A.J., and Oakey, R.J. (2006). Genomic Imprinting in Mammals: Emerging Themes and Established Theories. *PLOS Genet.* 2, e147.
- Wright, S.J., and Longo, F.J. (1988). Sperm nuclear enlargement in fertilized hamster eggs is related to meiotic maturation of the maternal chromatin. *J. Exp. Zool.* 247, 155–165.
- Yasuda, G.K., Schubiger, G., and Wakimoto, B.T. (1995). Genetic characterization of ms (3) K81, a paternal effect gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 140, 219–229.
- Yelick, P.C., Balhorn, R., Johnson, P.A., Corzett, M., Mazrimas, J.A., Kleene, K.C., and Hecht, N.B. (1987). Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2173–2179.
- Zalevsky, J., MacQueen, A.J., Duffy, J.B., Kempfues, K.J., and Villeneuve, A.M. (1999). Crossing over during *Caenorhabditis elegans* meiosis requires a conserved MutS-based pathway that is partially dispensable in budding yeast. *Genetics* 153, 1271–1283.
- Zetka, M., and Rose, A. (1995). The genetics of meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet. TIG* 11, 27–31.
- Zetka, M.C., Kawasaki, I., Strome, S., and Müller, F. (1999). Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes Dev.* 13, 2258–2270.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Behringer, R.R., Boissonneault, G., Yanagimachi, R., and Meistrich, M.L. (2004). Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genes. N. Y. N* 2000 38, 200–213.
- Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M.S., Mizuuchi, K., Krause, M., and Craigie, R. (2000). Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8997–9002.

