



HAL
open science

Etablissement et maintien de la niche germinale chez la petite roussette *Scyliorhinus canicula* et analyses fonctionnelles de facteurs à potentiel thérapeutique

Laura Gribouval

► To cite this version:

Laura Gribouval. Etablissement et maintien de la niche germinale chez la petite roussette *Scyliorhinus canicula* et analyses fonctionnelles de facteurs à potentiel thérapeutique. Biologie animale. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC267 . tel-03270776

HAL Id: tel-03270776

<https://theses.hal.science/tel-03270776>

Submitted on 25 Jun 2021

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.



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physiologie et Biologie des Organismes - Populations - Interactions

Préparée au sein de l'Université Caen Normandie

Etablissement et maintien de la niche germinale chez la petite roussette *Scyliorhinus canicula* et analyses fonctionnelles de facteurs à potentiel thérapeutique

**Présentée et soutenue par
Laura GRIBOUVAL**

**Thèse soutenue publiquement le 19/12/2017
devant le jury composé de**

| | | |
|-----------------------|--|--------------------|
| Mme Isabelle ALLEMAND | Directeur de Recherche, E5 CEA, Fontenay aux Roses | Rapporteur |
| Mr Bertrand PAIN | Directeur de Recherche, INRA, Bron | Rapporteur |
| Mr Martin PŠENIČKA | Chef de laboratoire, University of South Bohemia in České Budějovice | Examineur |
| Mme Jamileh MOVASSAT | Professeur des Universités, Université Paris Diderot | Examineur |
| Mme Aude GAUTIER | Maitre de conférences, Université de Caen Normandie | Examineur |
| Mr Pascal SOURDAINE | Professeur des Universités, Université de Caen Normandie | Directeur de thèse |

Thèse dirigée par Pascal SOURDAINE, UMR BOREA, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques



« Quoique tu rêves d'entreprendre, commence-le. L'audace a du génie, du pouvoir, de la magie. »

Johann Wolfgang Von Goethe

A mes parents,

Avant-propos

Ces travaux de Recherche ont été réalisés au sein de l'école doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé Environnement (EdNBISE) au laboratoire Biologie des Organismes et des Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), FRE3484 CNRS sous la direction du Professeur Pascal SOURDAINE et l'encadrement scientifique du Docteur Aude GAUTIER.



Cette thèse a été financée par une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) pilotée par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) et en collaboration avec l'entreprise KELIA (Saint Malo) où elle a été encadrée par le Président Directeur Général, le Docteur Pierrick AUVRAY, et le Docteur Elise DESSAUGE. Les travaux effectués s'inscrivent également dans le projet PEPTISAN labellisé par le Pôle Mer Bretagne et financé par le Conseil Régional de Normandie et les Fonds Européens de Développement Régional (FEDER).



Remerciements,

Dans un premier temps, je tiens à remercier mon directeur de thèse le professeur Pascal Sourdain, ainsi que monsieur Pierrick Auvray, président directeur général de la société KELIA, pour m'avoir fait confiance afin de réaliser cette thèse et m'avoir ainsi permis de m'épanouir dans le monde scientifique.

Pascal, j'ai énormément apprécié nos échanges scientifiques qui ont été très enrichissants pour moi. Votre culture scientifique ainsi que les conseils que vous m'avez prodigués me seront, j'en suis sûre, d'une utilité précieuse dans mon avenir professionnel Merci.

Pierrick, merci d'avoir toujours su être à l'écoute et d'avoir pris le temps dans votre emploi du temps chargé de discuter des hypothèses de travail à travers de riches échanges scientifiques. Je suis contente que l'aventure Malouine se poursuive.

J'adresse toute ma gratitude à Mme Isabelle Allemand, Mr Bertrand Pain, Mr Martin Psenicka, Mme Jamileh Movassat, Mme Aude Gautier et Mr Pascal Sourdain pour avoir accepté de constituer le jury de ce travail.

Je voudrais également remercier l'équipe scientifique encadrante dont j'ai pu bénéficier tout au long de ma thèse : Dr Elise Dessauge, Dr Aude Gautier ainsi que Cécile Guardièrè.

Elise, merci pour ta bonne humeur, tes précieux conseils scientifiques ainsi que ta patience. J'ai également beaucoup apprécié ton écoute, nos moments d'échanges, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Merci encore !

Cécile, merci d'avoir pris le temps de m'enseigner toutes les techniques et la rigueur du travail de paillasse en laboratoire. Tu m'as tellement appris ! Merci également pour tous les dépannages que tu as pu faire pour moi sur la côte malouine, sans compter la joie que j'ai eu à connaître toute ta famille. C'est un réel plaisir de travailler avec des personnes aussi compétentes que toi.

A vous deux, je souhaite quand même vous dédier la chanson de la reine des neiges si joliment chantée par des chœurs d'enfants...

Une petite pensée pour mon binôme préféré de HPLC-MS, Xaviera, qui s'est avérée être une grande pédagogue, dotée de beaucoup de patience. On partait de loin...! Merci !

Merci également à nos deux supers secrétaires Valérie et Patricia, deux sourires permanents qui égayent nos journées !

Enfin, je tiens également à remercier l'équipe de C-Ris pharma pour nos moments de partage.

Aude, merci pour tout. Tu as toujours été là pour me soutenir, trouver les mots justes dans mes moments de doute et être à l'écoute. Outre la confiance que tu m'as témoignée dans mon travail, tu as su m'inculquer ta rigueur dans le cheminement scientifique ainsi que dans la rédaction et la présentation des travaux. Ta constante bonne humeur est communicative. Je garde en souvenir beaucoup de bons moments.

Merci également à tous les enseignants chercheurs et le personnel de BOREA.

Je voudrais cependant remercier plus particulièrement Céline Zatljny-Gaudin pour m'avoir formée à l'analyse en masse, ainsi que pour tous les précieux conseils que vous m'avez donnés en peptidomique. Ce fut un réel plaisir de travailler avec quelqu'un de votre qualité.

Merci aux deux chefs de Bio-mol Christophe et Guillaume qui m'ont révélé les secrets cachés d'expériences réussies et qui, de par leur bonne humeur et leurs blagues ont permis que les longues manip de bio-mol semblent beaucoup plus courtes.

Merci Béatrice, pour ta disponibilité ainsi que pour tes précieux conseils d'histologie et ton savoir faire, le microtome n'a plus de secret pour moi et c'est bien grâce à toi ! Un grand merci à Sandra pour tous les dépannages et les préparations de dernière minute, lors de mes manip fastidieuses. Merci également à Marie-Pierre notre ACMO préférée !!

Merci également à Benoit Bernay et Maryline Guillamin pour leur aide technique et scientifique.

Merci à Frédéric et David pour leur travail à la Station de Luc.

Merci à Mme Sylvie Mazan, pour nous avoir accueillies au Centre de Recherche de Banyuls sur mer et nous avoir formées à une technique d'injection.

Je voudrais également remercier Cindy qui a réalisé son stage de M2 dans l'équipe pendant quelque mois, pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

Merci à deux personnes qui m'ont permis d'en arriver là : le docteur Dina Arvanitis pour m'avoir encadrée et formée lors de mon M2. Merci de m'avoir donné un enseignement d'une aussi bonne qualité et merci pour ton humanité. Merci également au docteur Julien Laussu, pour avoir cru en moi et m'avoir enrichie de tes connaissances.

Merci également à toute l'équipe de doctorants pour les fous rires, les serrages de coudes, les soutiens et nos longues discussions scientifiques, enfin plus ou moins ...

Je voudrais cependant remercier en particulier Alexandre pour m'avoir apporté le soutien technique pour l'alimentation de Lizie, et ses conseils de (vieux) sage. Mais également pour tous les bons moments passés autour d'un bon repas avec Tangni. A très vite pour la suite de nos aventures !

Merci à Max pour m'avoir fait apprécier la bonne odeur de l'andouillette et du livarot à de nombreux repas. Ça va me manquer !

Un énorme merci, à mon trio de choc, mes deux Aurore(s) et Julie la frite. Vous n'imaginez même pas l'impact que vous avez eu sur ma thèse... C'est grâce à vous que j'ai trouvé la force de venir au bureau dans les moments difficiles, juste à l'idée de retrouver Ju' pour un potin ou une folle chanson, Aurore pour une session mode ou la « petite » Aurore pour chercher des paillettes. Que de moments de rire, que de repas partagés, vous avez vraiment constitué ma famille du « Nord » et mes piliers. Cette thèse n'aurait vraiment pas été la même sans vous ! Ne changez surtout pas ! Vous allez tellement me manquer, on se revoit vite ! Girls power forever !!

Merci également à mes deux complices de bureau Steph et Floriane pour leur joie de vivre, Steph, merci pour ton apprentissage du basket, tes précieux conseils de « vieille » thésarde et tout le soutien que tu as pu m'apporter ! Floriane je suis ravie de voir que la relève est assurée par des personnes aussi top que toi ! Bon courage pour la suite !

Je remercie également ma famille, plus particulièrement un énorme merci à deux personnes exceptionnelles que sont mes parents Doudou et Moumou, pour m'avoir permis d'en arriver là, m'avoir soutenue et supportée. Vous avez toujours cru en moi, vous m'avez toujours suivie dans mes choix (même quand il a fallu que je parte loin de notre Sud) et vous avez toujours su trouver les mots justes dans les moments difficiles. L'enveloppe d'amour que vous m'avez confectionnée et dans laquelle je grandis depuis maintenant 27 ans n'a pas d'égal ! Je ne vous remercierai jamais assez ! Je vous aime.

Merci à ma mamie Madeleine, pour ces nombreux aller-retours en Normandie, le soutien et la force qu'elle a su me donner ! Tu es une mamie en or. Merci également à mes autres grands parents qui veillent sur moi depuis les étoiles Hélène, Edmond, Maurice et Jean.

Merci également à mon Boubou, pour l'amour que tu m'as apporté au quotidien, ton soutien, tes conseils, nos moments de partage autant scientifiques que personnels, mais également de m'avoir fait découvrir ta belle région « nordique ». Tu as été mon petit (grand) plus de cette thèse !

Merci également à ta famille, Fabienne, Daniel et Pierre pour m'avoir accueillie bons nombres de week-ends et de m'avoir permis de m'évader de par nos discussions et la découverte de la côte Cotentine !

Un grand merci à mes deux rayons de soleil, ma filleule Mélinda et mon filleul Noé qui m'ont donné l'énergie nécessaire pour réaliser cette thèse de par leur amour. Vous êtes des anges !

Je tiens également à remercier mes amies de toujours Mélissa, Marion et Flo qui ont toujours fait en sorte de m'aérer l'esprit lors de mes retours au pays !

Enfin, un grand merci à toute ma famille de cœur et de sang pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Je suis vraiment chanceuse de vous avoir.

Pour finir, un merci particulier à de grands protagonistes de cette thèse, mes roussettes adorées, qui ferait de l'ombre au film « Les dents de la mer » de par votre douceur, et la complicité que j'ai pu établir avec vous. Vous allez vraiment me manquer ! Vous êtes des supers requins !

Table des abréviations

1R/2R/3R WGD : First/second/third round of whole genome duplication

3 β HSD : 3 beta- hydroxysteroid dehydrogenase

A_{al} : Type A aligned undifferentiated spermatogonia

AB : Ammonium bicarbonate

ACN : Acetonitrile

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adenosine diphosphate

AKT (PKB) : Protein kinase B

ALX : Alloxan

AMP : antimicrobial peptide

AMPc : Adenosine monophosphate cyclic

APC : Adenomatous polyposis coli

APD : Antimicrobial Peptide Database

A_{pr} : type A paired undifferentiated spermatogonia

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

A_s : type A single undifferentiated spermatogonia

ATP : Adenosine triphosphate

A_u : Spermatogonie A indifférenciée

AUC : Area under the curve

A_{und} : type A undifferentiated spermatogonia

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

Bcl6b : B-cell CLL/lymphoma 6 member b protein

bhlh : Basic helix-loop-helix

BLBP : Brain lipid-binding protein

Blimp1 (PRDM1) : PR domain zinc finger protein 1

Bmi1 : Polycomb complex protein BMI-1

BMP : Bone Morphogenetic Proteins

BrdU : Bromodésoxyuridine

BSA : Bovine serum albumin

BTB : Blood-testis barrier

CBP : CREB-binding protein

CCL1/9 : Chemokine (C-C motif) ligand 1/9

CCR1 : C-C chemokine receptor type 1

Cd10 : Néprilysine

CD117 : c-Kit

CD123 : interleukin-3 receptor

CD133 : Prominin-1

CD138 : Syndecan 1

CD24 : cluster of differentiation 24

CD29 : Integrin beta-1

CD334 : Fibroblast growth factor receptor 4

CD34 : Hematopoietic progenitor cell antigen

CD38 : Cluster of differentiation 38

CD44 : CD44 antigen

CD45RA : Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C, RA isoform.

CD49 : Cluster of differentiation 49

CD49f (ITGA6) : Integrin subunit alpha 6

CD90 (Thy1) : Cluster of Differentiation 90

CDDP : cis-diaminedichloroplatine(II) ou Cisplatine

CDH1 : Cadherin 1 / Endothelial Cadherin= E-cadherin

CDX : Homeobox protein CDX

CHD7 : Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7

CIFRE : Convention Industrielle de Formation par la Recherche

c-Kit (SCFR): Mast/stem cell growth factor receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CREC : Centre de recherche en environnement côtier

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CS : Cellule Souche

CSF1 : Colony Stimulating Factor 1

CSF1R : Colony Stimulating Factor 1 Receptor

CXCL5 : C-X-C motif chemokine 5

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4

Cys : Cystéine

DAB : Diaminobenzidine

Dazl : Deleted in Azoospermia-Like (protein)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ENEM : Eagle's Minimum Essential Medium

Ephrin B : Eph family receptor interacting proteins B

EpiSCs : Epiblastic stem cells

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

ERM : Ets- related molecule = **Etv5**

ES : Embryonic stem cells

ESAM : Endothelial cell adhesion specific molecule

ESI : Electrospray ionization

eSPT : Elongated spermatid

EST : Expressed sequence tag

FBS : Fetal bovine serum

FDA : Food and Drug Administration

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2 = **bFGF**

FGFR : Fibroblast growth factor receptor

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FLK2 : Fetal liver kinase-2

FRET : Fluorescence resonance energy transfer

FRP : Frizzled-related protein

FSH : Follicle-stimulating hormone

FSHR : Follicle-stimulating hormone receptor

GB : Gonialblaste

GC : Germinal cells

G-CSF : Granulocyte colony stimulating factor

GDNF : Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GFP : Green Fluorescent Protein

Gfra1 : GDNF Family Receptor alpha 1

GLAST : Glutamate aspartate transporter

GLP-1 : Glucagon like peptide 1

GLT1 : The glutamate transporter 1

GLUT2 : Glucose transporter 2

GnRH : Gonadotropin-releasing hormone

GP : Germoplasme

GSC : Cellule Souche Germinale

H2B : Histone H2B

His : Histidine

HMG : High Mobility Group

HMGB3 : High mobility group protein B3

HMGCR : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase

Hopx : Homeodomain-only protein

HOX : Homeobox protein Hox

Hpf : Hours post fertilization

HPLC : High pressure liquid chromatography

HRP : Horseradish peroxidase

HSC : Hematopoietic stem cell

IC50 : Half maximal inhibitory concentration

Id4 : DNA-binding protein inhibitor 4

Ig : Immunoglobuline

IGF1 : Insulin like Growth Factor 1

IGF-1R : : Insulin like Growth Factor 1 receptor

IL-1 : Interleukin-1

IL3RA : Interleukin 3 receptor alpha

IL7RA : Interleukin-7 receptor subunit alpha

Int : Spermatogonie intermédiaire

IP : Intraperitoneal injection

IP : Iodure de propidium

IP₃ : Inositol trisphosphate

iPS : Induced pluripotent stem cells

IR-A/B : Insulin receptor A/B

ISC : Intestinal stem cells

ITT : Insulin tolerance test

IUCN : International union for the conservation of nature

Iv : Intravenous injection

Jag1 : Jagged1

JAK / STAT : Janus kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription

K5/8/14/18/19 : Keratin 5/8/14/18/19

Klf4 : Kruppel-like factor 4

KRB : Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer

LC : Least Concern

Lgr4 : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4

Lgr5 : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5

LH : Luteinizing hormone

LHR : Luteinizing hormone receptor

Lhx1 : LIM homeobox 1

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

Lin - : Lineage (negative) antigen

LMTT : Liquid meal tolerance test

Lrig1 : Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1

MABT : Maleic acid buffer containing Tween 20

MAP2K1 : Mitogen-activated protein kinase kinase 1

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MaSC : Mammary gland stem cells

MCM6 : DNA replication licensing factor MCM6

MEC : Matrice Extracellulaire

MEGA : Molecular evolutionary genetics analysis

MRM : Multiple reaction monitoring

MS : Mass spectrometry

MS/MS : Tandem mass spectrometry

mTert : Mouse telomerase reverse transcriptase

MYA : Million years ago

N-cadhérine : Neural cadherin

NCC : Neural crest cells

NG2 : Neural/glial antigen 2

NGN3 : Neurogenin 3

NP : Nanoparticle

NSC : Neural stem cells

NT : Not treated

Oct-3/4 : Octamer-binding transcription factor 3/4

OD : *Optical density*

OGTT : *Oral glucose tolerance test*

OPN : *Osteopontin*

P- Cadhérine : *Placental cadherin*

Pax6 : *Paired box protein Pax-6*

PBS : *Phosphate buffered saline*

PCR : *Polymerase chain reaction*

Pdgf : *Platelet-derived growth factor*

PFA : *Paraformaldehyde*

PGCs : *Primordial germ cells*

PGE2 : *Prostaglandin E2*

PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*

PIP₃ : *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*

PKC : *Protein kinase C*

PLZF : *Promyelocytic Leukaemia Zinc-Finger protein*

PO : *Per os*

POU2/POU5f1 : *Octamer-binding transcription factor 4*

PP : *Polypeptide Pancréatique*

pPep12/14/15/16/18/20/21/28 : *Précurseur du peptide Pep12/14/15/16/18/20/21/28*

pRB : *Retinoblastoma protein*

PrSC : *Prostate stem cells*

PSA : *Prostate-specific antigen*

pSSC : *Cellule Souche Spermatogoniale Potentielle*

qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*

RC1,2 : *radial cell markers 1,2*

REK : *Serine/threonine-protein kinase SAPK3*

RET : *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor*

RNP : *Ribonucléoprotéine*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

rSPT : *Round spermatid*

RT : *Room temperature*

RunX : *Runt-related transcription factor*

Sall4 : *Spalt like transcription factor 4*

SCA1 : *Stem cells antigen-1*

SCF 1 : *Stem cell factor 1 = KitL*

SDF-1 : *Stromal cell-Derived Factor 1 = CXCL12*

SDS PAGE : *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFK : *Src family of protein tyrosine kinases*

Sfrp1 : *Secreted frizzled-related protein 1*

Sfxn : *Sideroflexin*

Shh : *Sonic HedgeHog*

Slamf1 : *Signaling lymphocytic activation molecule family 1*

Sox 2/9 : *(sex determining region Y)-box 2/9*

SPC I : *Spermatocyte primaire*

SPC PL : *Spermatocyte pré-leptotène*

SPG : *Spermatogonie*

SSCs : *Spermatogonial stem cells*

SSEA-1/3/4 : *Stage-specific embryonic antigen-1/3/4*

STZ : *Streptozotocin*

Suz12 : *Polycomb gene Suz12*

T2DM : *Type 2 diabete metillus*

TCR : *T cell receptor*

TER : *Single long non-coding telomerase ribonucleic acid (RNA)*

TERT : *Telomerase reverse transcriptase*

TFA : *Trifluoroacetic acid*

TGAF : *Transforming growth factor signaling pathway*

TGFβ : *Transforming growth factor beta*

Tie : *Angiopoietin receptor*

TMAO : *Trimethylamine-N-oxide*

TN-C : *Tenascin C*

TOF/TOF : *Time-of-flight mass spectrometry*

TPP : *Tripolyphosphate*

TRA1-60/81 : *Transcription-associated protein
1-60/81*

TROP 2 : *Tumor-associated calcium signal
transducer 2*

TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase
dUTP Nick End Labeling*

Upd : *Unpaired*

UTR : *Untranslated Region*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VSEL : *Very small embryonic like stem cell*

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 1 |
| 1. Les cellules souches..... | 3 |
| a. Divers types de cellules souches | 3 |
| b. La niche, un microenvironnement particulier | 6 |
| c. Caractéristiques des cellules souches | 9 |
| d. La niche des cellules souches, source de molécules à potentiel thérapeutique | 14 |
| e. Applications | 16 |
| 2. Les cellules souches spermatogoniales..... | 20 |
| a. Les spermatogonies à la base de la spermatogenèse | 20 |
| b. Organisations testiculaires | 22 |
| c. Caractérisation structurale des spermatogonies chez différentes espèces | 25 |
| d. Caractérisation moléculaire des SSCs..... | 28 |
| e. La niche germinale, un environnement très riche pour contrôler le devenir des SSCs | 36 |
| f. La dynamique du compartiment souche..... | 40 |
| g. Les SSCs, des cellules utiles pour la préservation d'espèces..... | 42 |
| 3. Le modèle <i>Scyliorhinus canicula</i> | 47 |
| a. Appartenance au groupe peu étudié des Chondrichthyens | 47 |
| b. Une espèce de nos côtes, non vulnérable..... | 49 |
| c. Une organisation testiculaire cystique et polarisée | 51 |
| d. Un ovaire unique. | 59 |
| e. Un développement embryonnaire lent..... | 61 |
| f. Une différenciation gonadique peu caractérisée | 67 |
| 4. Objectifs | 70 |
| | |
| Chapitre 1..... | 72 |
| The nanos1 gene was duplicated in early Vertebrates and the two paralogs show different gonadal expression profiles in a shark. | 73 |

| | |
|--|------------|
| Chapitre 2 | 125 |
| Characterization of potential spermatogonial stem cells and development of their transplantation in the little spotted dogfish <i>Scyliorhinus canicula</i> | 126 |
| Chapitre 3 | 157 |
| Etude de la chimiokine SDF-1 et de son récepteur CXCR4 dans le testicule de petite roussette..... | 158 |
| Chapitre 4 | 172 |
| Shark peptides induce insulin secretion in in vitro and in vivo mammalian model..... | 173 |
| Chapitre 5 | 209 |
| Evaluation du potentiel anti-cancéreux de deux peptides issus de la petite roussette sur des cellules de carcinome pulmonaire humain..... | 210 |
| Discussion | 227 |
| 1. Des Chondrichtyens aux Tétrapodes, entre conservations et divergences..... | 228 |
| 2. La transplantation pour la sauvegarde d'espèces..... | 234 |
| 3. Les peptides utilisés en thérapie..... | 240 |
| Bibliographie | 252 |
| Annexe | 278 |
| CHAPITRE D'OUVRAGE | 279 |
| Spermatogenesis and Spermogenesis in Elasmobranchs, a short overview..... | 279 |

Listes des figures et des tableaux

| | |
|--|-----------|
| <i>Figure 1 : Des cellules souches pluripotentes peuvent être dérivées à différents stades de développement.....</i> | <i>2</i> |
| <i>Figure 2 : Différentes niches de cellules souches ont été décrites chez l'adulte.</i> | <i>5</i> |
| <i>Figure 3 : Trois voies de régulation sont classiquement impliquées dans l'autorenouveaulement, la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches.</i> | <i>8</i> |
| <i>Figure 4 : Différentes méthodologies permettent de démontrer la pluripotence de cellules isolées.</i> | <i>11</i> |
| <i>Figure 5 : Les cellules souches sont hétérogènes et présentent des profils hiérarchiques réversibles.....</i> | <i>13</i> |
| <i>Figure 6 : Schéma représentant les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'auto-renouveaulement des cellules souches et dont la dérégulation peut induire des tumeurs.</i> | <i>17</i> |
| <i>Figure 7 : Organisation testiculaire cystique et non cystique.....</i> | <i>21</i> |
| <i>Figure 8 : Les SSCs peuvent être réunies dans une région testiculaire.....</i> | <i>23</i> |
| <i>Figure 9 : Synthèse de marqueurs spécifiques de cellules souches spermatogoniales.</i> | <i>30</i> |
| <i>Figure 10 : Schéma représentant les voies régulant l'autorenouveaulement des cellules souches spermatogoniales (SSC) dans les testicules de souris.....</i> | <i>35</i> |
| <i>Figure 11 : Les SSCs s'autorenouveaulement selon divers modes.....</i> | <i>39</i> |
| <i>Figure 12 : Présence de nouvelle niche plus en périphérie chez un Mammifère et des Ostéichtyens.</i> | <i>41</i> |
| <i>Figure 13 : La transplantation de SSCs chez le poisson-zèbre.....</i> | <i>43</i> |
| <i>Figure 14 : Arbre phylogénétique simplifié des Vertébrés.</i> | <i>46</i> |
| <i>Figure 15 : La petite roussette Scyliorhinus canicula.</i> | <i>48</i> |
| <i>Figure 16 : Photo et schéma du tractus génital mâle chez la petite roussette.</i> | <i>50</i> |
| <i>Figure 17 : Les différentes organisations testiculaires chez les élastmobranches.</i> | <i>52</i> |
| <i>Figure 18 : Une organisation testiculaire cystique chez Scyliorhinus canicula.</i> | <i>54</i> |
| <i>Figure 19 : Caractérisation des SSCs chez S. canicula.</i> | <i>56</i> |
| <i>Figure 20 : Appareil génital femelle de la petite roussette S. canicula.</i> | <i>58</i> |

| | |
|---|------------|
| <i>Figure 21 : Organisation tissulaire et cellulaire des ovaires de deux espèces d'éla-smobran-ches.</i> | <i>60</i> |
| <i>Figure 22 : Schéma d'œufs de petite roussette juste après l'ovoposition et à terme.</i> | <i>62</i> |
| <i>Figure 23 : Chronologie du développement de l'embryon de petite roussette.</i> | <i>64</i> |
| <i>Figure 24 : Mécanismes de spécification des cellules germinales par épigénèse et par préformation.</i> | <i>66</i> |
| <i>Figure 25 : Identification des séquences CXCR4 et SDF-1 (CXCL12) chez la petite roussette S. canicula.</i> | <i>169</i> |
| <i>Figure 26 : Immunolocalisation de SDF-1 et CXCR4 dans le testicule de roussette adulte. ..</i> | <i>170</i> |
| <i>Figure 27: Détection de CXCR4 et SDF-1 dans des cultures de cellules souches spermatogoniales de roussette.</i> | <i>171</i> |
| <i>Figure 28: Pep 12 et Pep15 diminuent la viabilité des cellules cancéreuses pulmonaires in vitro.</i> | <i>222</i> |
| <i>Figure 29 : Résultats préliminaires de l'effet de Pep12 et Pep15 sur la croissance tumorale in vivo.</i> | <i>223</i> |
| <i>Figure 30: Résultats préliminaires du test de Pep12 et de Pep15 à induire l'apoptose ou la nécrose de cellules cancéreuses in vitro.</i> | <i>225</i> |
| <i>Figure 31: Tests préliminaires de l'impact de Pep12 et de Pep15 sur la prolifération cellulaire des cellules Calu-6 déterminé par cytométrie de flux.</i> | <i>226</i> |
| <i>Figure 32 : Schéma représentant l'intérêt de la transplantation chez les chondrichthyens dans la sauvegarde d'espèces.</i> | <i>238</i> |
| <i>Figure 33 : Schéma des voies insulinémiques ciblées par les différentes drogues.</i> | <i>241</i> |
| <i>Figure 34: Protocole expérimental pour déterminer le mode d'action de Pep18.</i> | <i>243</i> |
| <i>Figure 35 : Expression du précurseur de Pep12 et de Pep15 dans le testicule de S.canicula.</i> | <i>247</i> |
| <i>Figure 36 : Expression du précurseur de Pep18 dans le testicule de S.canicula.</i> | <i>249</i> |

| | |
|--|-----------|
| <i>Tableau 1 : Les cellules souches expriment différents marqueurs et sont régulées par différentes voies en fonction de leur type, de leur état au cours du développement et à l'âge adulte.</i> | <i>13</i> |
|--|-----------|

Introduction

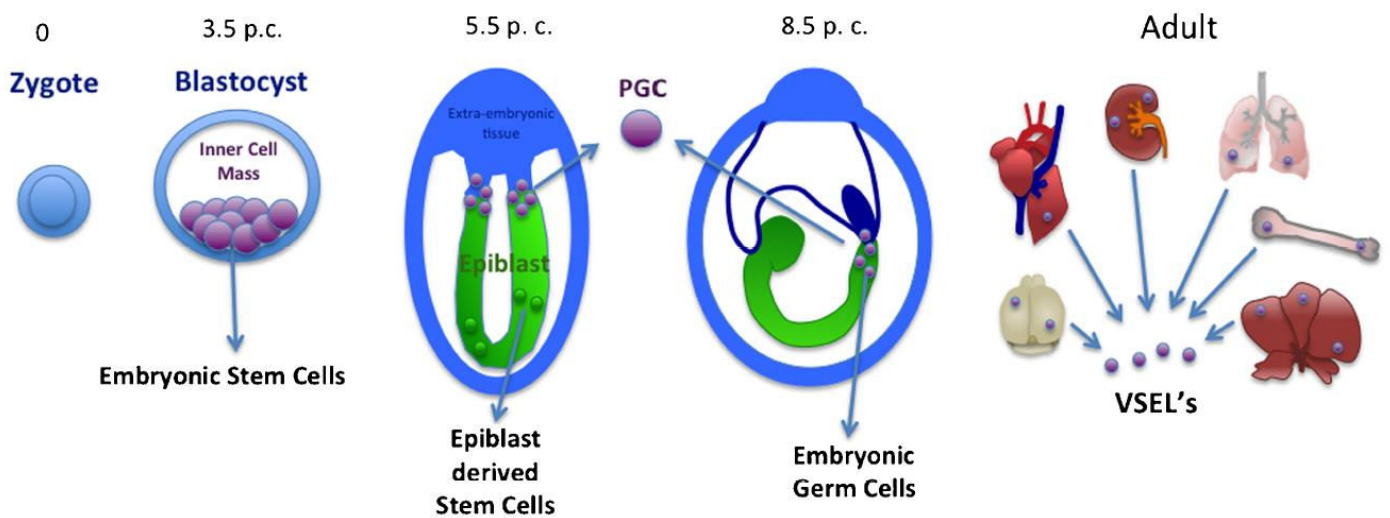


Figure 1 : Des cellules souches pluripotentes peuvent être dérivées à différents stades de développement.

Chez la souris, des cellules souches embryonnaires (ES) peuvent être dérivées de la masse cellulaire interne à 3,5 jours post-coïtum (3,5 p.c.). Puis, des cellules souches épiblastiques et des cellules germinales primordiales (PGCs) peuvent être isolées et propagées dans différentes conditions de culture. Chez l'adulte, des VSELs, Very Small Embryonic Like cells, ont été détectées dans différents tissus, incluant la moëlle osseuse, le cœur, les reins, le cerveau et les poumons. Schéma issu de Kassmer et Krause, 2013.

1. Les cellules souches

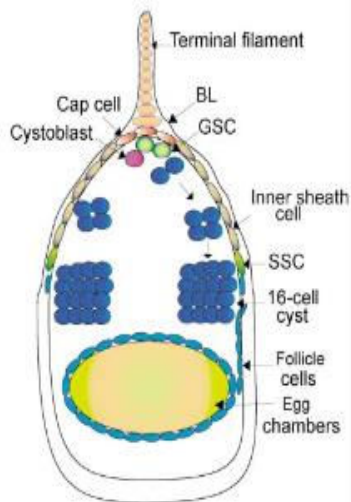
a. Divers types de cellules souches

Les cellules souches (CS) se distinguent des autres cellules de par leur capacité d'autorenouveau et de différenciation. Elles sont présentes dans tous les organismes multicellulaires et jouent un rôle crucial dans le développement des organismes ainsi que dans le maintien de leur intégrité au cours de la vie (Heidstra and Sabatini, 2014). Au niveau embryonnaire, les cellules souches ont un potentiel prolifératif important ainsi qu'une grande capacité de différenciation. Les premières cellules souches caractérisées sont la cellule œuf et les blastomères précoces. Ce sont les seules cellules totipotentes décrites, c'est-à-dire capables de se différencier en toutes les cellules issues des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme ou endoderme) mais également en toutes les cellules des annexes embryonnaires (trophoblaste, vésicule vitelline, allantoïde, amnios). Leur capacité de totipotence est rapidement perdue *in vivo* après la différenciation du trophoblaste. A ce jour, seules quelques études ont permis le maintien de ce caractère *in vitro* (Xu *et al.*, 2002). Un peu plus tard dans le développement embryonnaire mais toujours à des stades précoces, les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste constituent un ensemble de cellules souches (Figure 1). Elles ont perdu leur caractère totipotent pour se restreindre à un caractère pluripotent. En se différenciant, elles vont permettre de générer les différents tissus appartenant à chacun des feuilletts embryonnaires à l'origine des différents organes comme la peau (issue de l'ectoderme), les vaisseaux sanguins (issus du mésoderme) ou encore le tube digestif (issu de l'endoderme) (Thomson *et al.*, 1995). Plus tard dans le développement, les cellules germinales primordiales (PGCs) et les cellules souches épiblastiques (EpiSCs) peuvent être isolées et cultivées comme des lignées cellulaires pluripotentes (Figure 1).

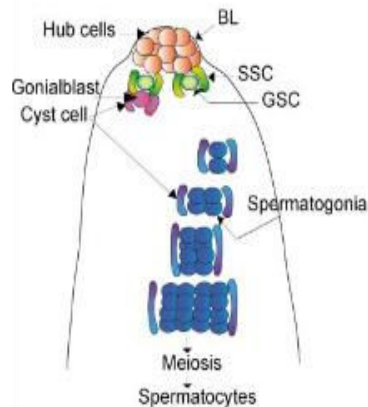
Concernant les cellules souches chez des individus adultes, une équipe de chercheurs canadiens a montré en 1961 que dans le tissu hématopoïétique, une catégorie de cellules pouvait, une fois injectée dans des souris irradiées, former des colonies au niveau de la rate (Till and McCulloch, 1961). Les cellules composant les colonies étaient capables de proliférer et de se différencier en trois lignées à l'origine des cellules sanguines : les cellules érythrocytaires, les cellules granulaires et les mégacaryocytes. Des cellules souches sont alors, pour la première fois décrites chez l'adulte. Bien caractérisées chez la souris, elles présentent

deux caractéristiques qui les différencient des autres cellules adultes. Premièrement, elles sont capables d'auto-renouvellement, c'est-à-dire, de générer des clones d'elles-mêmes afin de garder un pool de cellules souches, qui pourra être mobilisé en fonction des différents besoins cellulaires de l'organisme. Cette nouvelle génération cellulaire est obtenue par divisions symétriques avec une génération de deux cellules souches, ou lors de divisions asymétriques où une des cellules gardera un potentiel souche alors que sa cellule sœur s'engagera dans une spécification cellulaire donnée (Morrison and Kimble, 2006). Deuxièmement, ces cellules peuvent se différencier avec des capacités variables d'uni-, multi-, ou pluripotence (Hima Bindu and Srilatha, 2011). En fonction de l'environnement dans lequel elles évoluent, elles vont pouvoir soit avoir un potentiel de différenciation limité mais un fort pouvoir de prolifération, c'est le cas des cellules souches épidermales (Gomez *et al.*, 2013) à l'origine d'un seul type cellulaire, donc unipotentes ; soit se différencier en plusieurs types cellulaires mais avec une différenciation limitée à certains lignages comme les cellules souches mésenchymateuses capables de se différencier en cellules des lignées ostéoblastiques, chondrocytaires et adipocytaires (Pittenger *et al.*, 1999) et donc multipotentes. Néanmoins, il est important de souligner que des cellules souches unipotentes et multipotentes, une fois extraites de leur microenvironnement peuvent devenir pluripotentes *in vitro* ou *in vivo*. Par exemple, la transplantation de cellules souches neurales murines (multipotentes) préalablement mises en culture, puis transplantées dans des embryons de poulet ou de souris peut générer des cellules issues des trois feuillets embryonnaires (Clarke *et al.*, 2000). C'est aussi le cas pour les cellules souches spermatogoniales (Conrad *et al.*, 2008). Par ailleurs, de rares cellules exprimant des marqueurs de pluripotence tels que SSEA-1, Oct-4, Nanog ou encore Rex1 ont été détectées dans la moelle épinière de souris adulte. L'analyse morphologique de ces cellules a révélé qu'elles étaient de petite taille (3 à 6 μm), qu'elles avaient un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et que leur chromatine était plutôt décondensée, caractéristiques spécifiques des cellules souches embryonnaires. Après culture, ces « very small embryonic like stem cells » (VSELs) sont capables de se différencier en cellules issues des trois feuillets embryonnaires en fonction des microenvironnements dans lesquels elles évoluent (Kucia *et al.*, 2006). Elles présentent une large distribution dans l'organisme puisqu'elles ont été retrouvées dans différents organes comme le foie, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau (Kassmer and Krause, 2013) (Figure 1). Récemment, des cellules souches

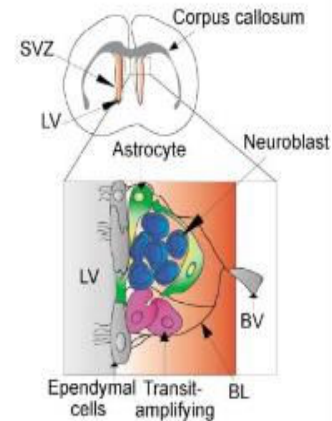
A Germarium



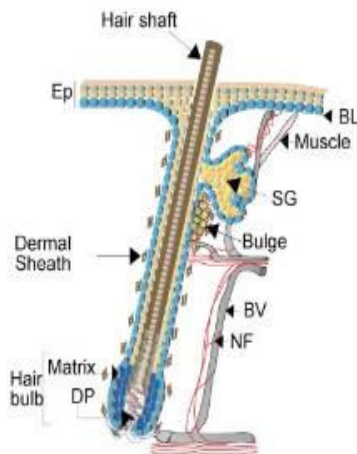
B Niche



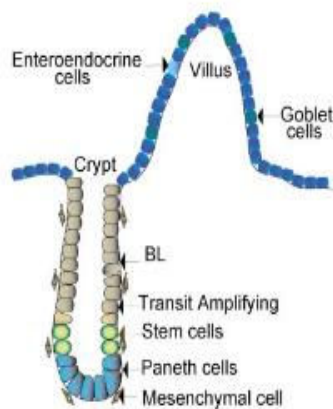
C Niche de la zone sous-ventriculaire cérébrale



D Niche du follicule



E Niche de la crypte



F Niche

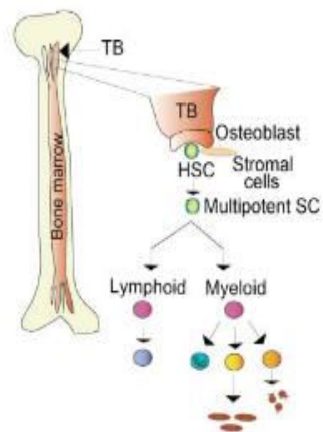


Figure 2 : Différentes niches de cellules souches ont été décrites chez l'adulte.

La niche des cellules souches germinales est illustrée dans l'ovaire et le testicule de drosophile (A, B). Les niches d'autres cellules souches sont également décrites : celle des cellules souches nerveuses (C), du follicule pileux (D), intestinales (E) et hématopoïétiques (F). BL : lame basale, GSC : cellules souches germinales, SSC : cellules souches somatiques, SVZ : zone sous ventriculaire, LV : ventricule latéral, BV : vaisseau sanguin, Ep : épiderme, SG : glande sébacée, NF : fibres nerveuses, DP : papille dermique, TB : os trabéculaire, HSC : cellules souches hématopoïétiques. Schéma issu de Fuchs et al., 2004.

ont également été décrites dans d'autres organes, de ce fait, et au vu de la complexité de ce domaine, cette partie de thèse ne présente en aucun cas une revue exhaustive sur les cellules souches.

Il existe donc une multitude de cellules souches, chez l'embryon mais également chez l'adulte. Néanmoins, l'activité proliférative et de différenciation de ces cellules varie au cours de la vie d'un individu. Il est intéressant de souligner que dans un contexte *in vivo*, certaines CS, comme les cellules souches neurales à l'origine des neurones et des cellules gliales ou les cellules souches ovogoniales des Mammifères à l'origine de la production des gamètes femelles, vont avoir de fortes activités prolifératives pendant l'embryogenèse mais peu d'activité chez les individus adultes (Johnson *et al.*, 2004; Stiles and Jernigan, 2010). En revanche, d'autres cellules comme les cellules souches hématopoïétiques à l'origine des cellules sanguines, les cellules souches spermatogoniales à l'origine de la spermatogenèse ou les cellules souches ovogoniales de poisson, vont générer une multitude de cellules qui vont être produites tout au long de la vie de l'individu (Nakamura *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2010; Palis, 2014).

Enfin, en plus des cellules souches naturelles, un autre type de cellules pluripotentes a récemment été produit, les cellules pluripotentes induites (iPS). Ces cellules sont issues de cellules différenciées adultes, reprogrammées *in vitro*, par transgénèse en cellules dédifférenciées pluripotentes. La surexpression de quatre gènes *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* et *Klf4* est suffisante pour éteindre les autres gènes de différenciation exprimés par la cellule et de ce fait lui conférer un potentiel souche (Takahashi et Yamanaka, 2006). Ainsi, toute cellule ayant gardé un potentiel de prolifération peut être reprogrammée, ouvrant de nombreuses possibilités pour des utilisations cliniques notamment.

b. La niche, un microenvironnement particulier

Les cellules souches adultes évoluent dans un microenvironnement particulier appelé « niche », un concept proposé la première fois par Schofield, en 1978. Des niches de cellules souches ont été identifiées dans divers tissus : le testicule, la moelle osseuse, la peau, l'intestin, le cerveau (Fuchs *et al.*, 2004) (Figure 2). La niche se compose de cellules souches mais également de leurs progéniteurs et de diverses cellules différenciées, qui vont sécréter différents facteurs et organiser un milieu riche en matrice extracellulaire afin de permettre

aux CS de survivre et de garder leur potentiel souche. Elle permet aussi de réguler la balance entre l'autorenouveau et la différenciation des cellules souches afin qu'elles puissent assurer leur fonction de régénération tissulaire, en remplaçant les cellules mortes naturellement (perte stochastique) ou lors d'une lésion, mais aussi permettre une adaptation à un état physiologique.

Tout d'abord, une des fonctions primaires de la niche est d'ancrer les cellules souches au sein du microenvironnement. Chez les Mammifères, la N-cadhérine (Zhang *et al.*, 2011a), la E-cadhérine (CDH1) (Chen *et al.*, 2015) ainsi que d'autres molécules d'adhésion comme l'intégrine $\alpha 6$ (Krebsbach and Villa-diaz, 2017) sont impliquées dans l'interaction cellules souches/environnement. Le mode de division symétrique ou asymétrique des cellules souches peut dépendre directement de cet ancrage à la niche. Chez la drosophile, la division asymétrique des cellules souches germinales met en jeu le centrosome ainsi que la protéine APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), localisée au niveau cortical, pour orienter le fuseau mitotique perpendiculairement à la niche. Suite à cette division, la cellule qui reste en contact avec la niche garde son potentiel souche alors que sa cellule sœur, détachée de la niche, s'engage dans la voie de différenciation (Yamashita *et al.*, 2003).

Au sein de la niche, différents facteurs assurent le « homing », c'est-à-dire un phénomène d'écotaxie des cellules souches dans la niche. Ainsi, on retrouve des molécules d'ancrage comme l'intégrine $\beta 1$ dans la niche germinale (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008a). Mais également des facteurs comme la chimiokine SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor 1*) qui est sécrétée par les cellules endothéliales sinusoidales de la moelle épinière alors que son récepteur CXCR4 est exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ (pour revue, Sharma *et al.*, 2011). La liaison du ligand à son récepteur va alors permettre une rétention des cellules souches au sein de la niche hématopoïétique (pour revue, Sharma *et al.*, 2011). Par ailleurs, la perturbation de l'expression de la chimiokine SCF (*Stem Cell Factor*) qui interagit avec son récepteur c-Kit, un récepteur tyrosine kinase, amène à des défauts de l'hématopoïèse ou de développement des cellules germinales (pour revue, Whetton and Graham, 1999).

Un autre rôle de la niche est de réguler la prolifération mais également la différenciation des cellules souches. Diverses voies de signalisation sont impliquées dans ces deux types de

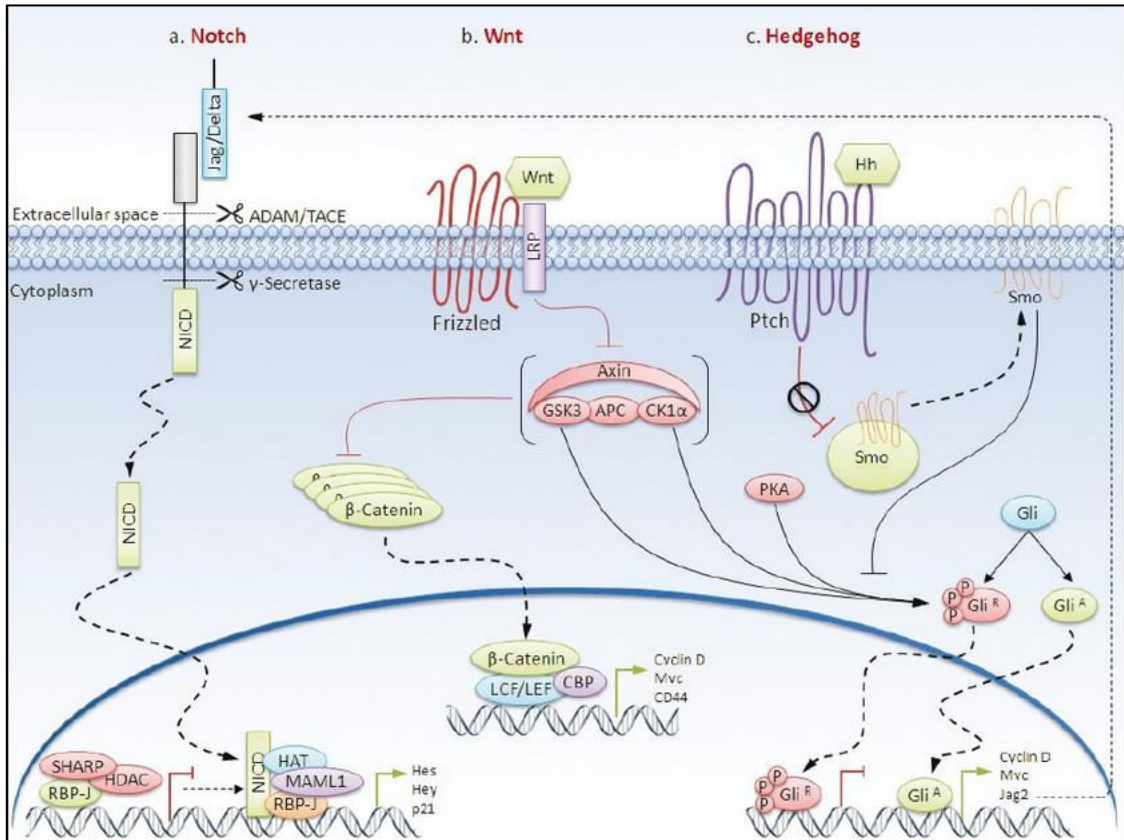


Figure 3 : Trois voies de régulation sont classiquement impliquées dans l'autorenouveau, la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches.

Les voies Wnt, Notch et Hedgehog et leurs cascades de signalisation respectives sont généralement impliquées dans la régulation de gènes de survie, de prolifération et de différenciation des cellules souches. Schéma issu de Malhotra *et al.*, 2011.

régulation. La voie Wnt/caténine- β est engagée par exemple dans l'autorenouveau des cellules souches hématopoïétiques *in vitro* et *in vivo*, neurales *in vitro* (Reya *et al.*, 2003; Kalani *et al.*, 2008) et permet la prolifération des cellules souches spermatogoniales (SSCs) *in vitro* chez la souris (Golestaneh *et al.*, 2009). La voie Notch quant à elle contribue au maintien des HSCs *in vitro* et *in vivo* dans un état indifférencié (Varnum-Finney *et al.*, 2000). De plus, la perturbation de l'expression de Notch dans la niche ovarienne chez la drosophile engendre la différenciation des cellules souches germinales (GSCs) et leur migration hors de la niche (Ward *et al.*, 2006). Enfin, la voie Sonic Hedgehog permet de réguler la balance entre la quiescence et l'activation des cellules souches neurales au niveau de la zone sous-ventriculaire (Daynac *et al.*, 2016) et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques *in vivo* (Bhardwaj *et al.*, 2001) (Figure 3). Ainsi, la niche joue un rôle crucial dans la régulation des cellules souches aussi bien au niveau de leur survie, de leur prolifération, qu'au niveau de leur différenciation, et contribue de ce fait au maintien de l'intégrité tissulaire.

c. Caractéristiques des cellules souches

Les cellules souches sont caractérisées par leur capacité d'autorenouveau sur le long terme *in vivo* mais aussi en culture (Kokkinaki *et al.*, 2011). Bien que généralement quiescentes chez l'adulte au sein des tissus, les CS mises en culture dans un milieu adapté prolifèrent activement et forment des colonies qui peuvent être maintenues à long terme (plus de 2 ans) de par leur capacité d'autorenouveau et de maintien sans se différencier (Servili *et al.*, 2009). Une forte activité télomérase confère aux CS leur caractère « immortel » (pour revue, Huang *et al.*, 2014). La télomérase est une enzyme composée de deux sous unités, la TERT (*Telomerase reverse transcriptase*) et la TER (single long non-coding telomerase RNA) servant de matrice pour l'addition d'une séquence répétée (TTAGGG)_n d'ADN au niveau des télomères. Les divisions cellulaires engendrant un raccourcissement progressif des télomères dont la longueur est un régulateur essentiel de la prolifération et de la sénescence cellulaire, les cellules à fort pouvoir prolifératif, comme les cellules souches, présenteront une activité télomérase élevée.

Le maintien du caractère indifférencié des CS est lié à l'expression des facteurs de transcription Oct4 (ou POU5f1), Nanog et Sox2, qui sont surexprimés dans les CS. En effet, dans les cellules ES, la diminution de moitié de l'expression d'Oct4 engendre la différenciation

des cellules en trophoblaste (pour revue, Shi and Jin, 2010). Sox2 quant à lui, est impliqué dans le maintien de la pluripotence et sa délétion dans les cellules ES entraîne la différenciation des cellules en cellules du trophectoderme (Masui *et al.*, 2007). Enfin, lorsque Nanog n'est plus exprimé dans des embryons de souris, les cellules de la masse interne restent au stade « pré-pluripotence », un stade indéterminé qui engendre une non viabilité des embryons (Silva *et al.*, 2009). Ces différents facteurs de transcription sont plutôt des facteurs de transcription activateurs. Ils agissent en se fixant sur les régions régulatrices des gènes cibles et augmentent l'expression de gènes comme *Id4*, gène suppresseur de différenciation cellulaire activé par POU5f1 et Sox2, ou comme *Sfrp1*, gène de pluripotence activé par POU5f1 et Nanog (Sharov *et al.*, 2008). En plus de leur potentiel activateur, on peut également noter que ces facteurs de transcription sont capables de supprimer de façon indirecte l'expression de gènes de différenciation. POU5f1 par exemple, augmente l'expression de gènes polycomb comme *Suz12* qui sont responsables du maintien de la chromatine dans un état compacté, bloquant ainsi l'accès de la machinerie de transcription aux gènes de différenciation (Sharov *et al.*, 2008).

Les cellules souches présentent également des marqueurs de surface spécifiques qui permettent de les identifier tels que par exemple les antigènes spécifiques de stades embryonnaires 3 et 4 (SSEA3, SSEA4) qui sont des glycosphingolipides. Ils ont été caractérisés comme marqueurs de cellules souches embryonnaires humaines (Thomson *et al.*, 1998) et SSEA4 comme marqueur de cellules souches mésenchymateuses et de cellules souches spermatogoniales humaines (Gang *et al.*, 2007; Kokkinaki *et al.*, 2011). Même si leur rôle dans la pluripotence ou l'autorenouveaulement des cellules souches n'a pas encore été défini (Brimble *et al.*, 2007), des études ont montré que les glycosphingolipides étaient capables d'interagir avec des protéines membranaires comme les intégrines ou la cavéoline-1 pour réguler l'adhésion, la prolifération et la motilité chez d'autres types cellulaires (Ho *et al.*, 2016). Une autre caractéristique des cellules souches est d'avoir une activité phosphatase alcaline élevée (O'Connor *et al.*, 2008). Cependant, ce marqueur est controversé car même s'il est très exprimé dans les cellules ES, les PGCs (Hahnel *et al.*, 1990) et dans les SSCs (Lim *et al.*, 2014), une forte activité phosphatase alcaline n'a pas été démontrée dans d'autres tissus contenant des cellules souches (Stefkova *et al.*, 2015). Enfin, les CS isolées de leur microenvironnement et mises en culture ont montré qu'elles étaient pluripotentes de par leur

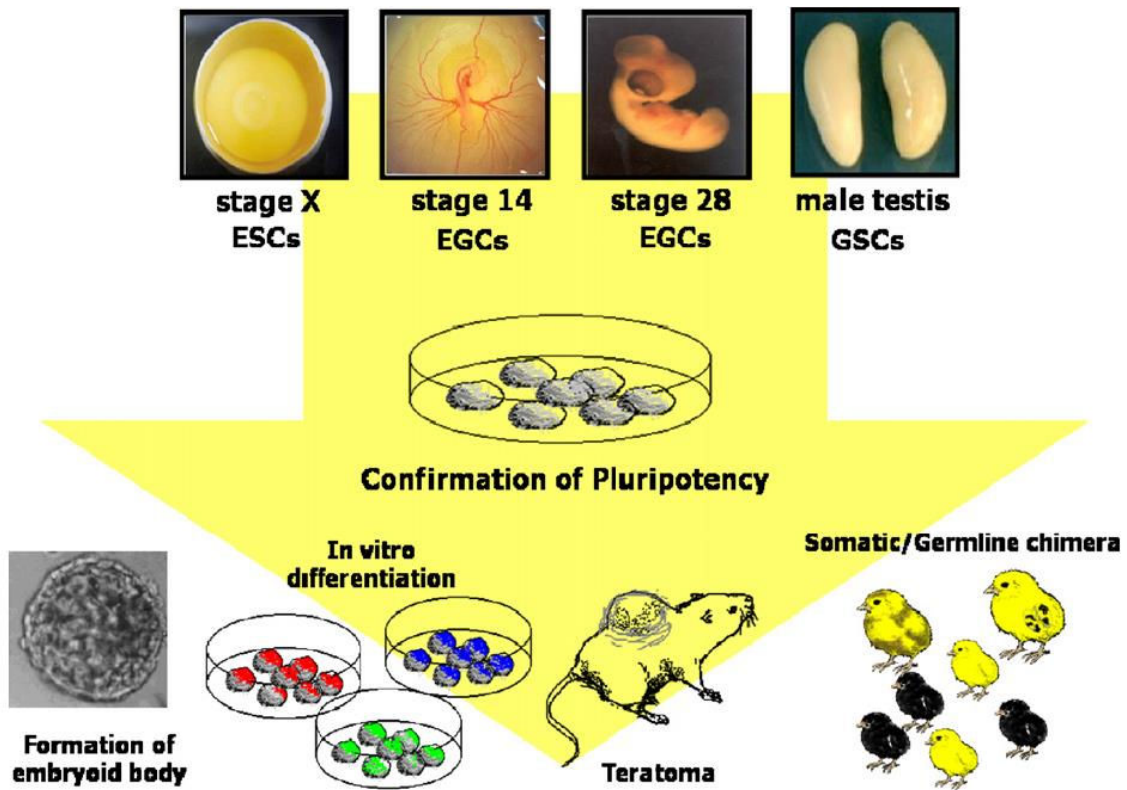


Figure 4 : Différentes méthodologies permettent de démontrer la pluripotence de cellules isolées.

Le caractère souche de cellules, dérivées de différentes sources, dans cet exemple chez le poulet, peut être démontré par la formation de corps embryoides ou la différenciation en différents lignages *in vitro* mais aussi *in vivo* par la formation d'un tératome après injection sous-cutanée dans une souris immunodéprimée ou la formation de chimères. ESCs : cellules souches embryonnaires, EGSs : cellules germinales embryonnaires, GSCs : cellules souches germinales. Schéma issu de Han, 2009.

capacité à se différencier en cellules issues des trois feuillets embryonnaires (Thomson *et al.*, 1998; Pittenger *et al.*, 1999). Par la technique de culture des cellules dans une goutte de milieu suspendue (*hang drop*), il a été montré qu'elles sont capables de former de façon spontanée des agrégats cellulaires appelés corps embryoïdes (Figure 4). Les corps embryoïdes simulant la gastrulation, ils se différencient spontanément en cellules issues des 3 feuillets. La différenciation embryonnaire caractérisée par des marqueurs moléculaires spécifiques (Itskovitz-eldor *et al.*, 2000) des cellules souches *in vitro* peut également être induite par l'ajout ou la suppression de facteurs spécifiques. Par exemple, l'ajout d'acide rétinoïque ou d'activine A stimule, respectivement, une différenciation en ectoderme ou en endoderme des cellules souches embryonnaires (Poh *et al.*, 2014) (Figure 4). L'un des tests *in vivo* est l'obtention de chimères par injection de CS issues d'un donneur dans un receveur qui peut être à un stade de morula (technique par agrégation) ou blastocyste (Wood *et al.*, 1993) (Figure 4). Si les cellules s'avèrent être pluripotentes, les cellules du donneur auront la propriété de s'intégrer dans les différents tissus de l'individu y compris dans la lignée germinale. En revanche, si les cellules ont un potentiel multipotent, elles ne seront présentes que dans des cellules d'un seul type de feuillet embryonnaire, voire dans un ou plusieurs lignages tissulaires (Mascetti and Pedersen, 2016). Un second test *in vivo* est l'injection sous-cutané des cellules pluripotentes à un individu receveur immunodéprimé afin de générer un tératome (Figure 4). Il s'agit d'une tumeur bénigne qui a un pouvoir de prolifération important *in vivo* et qui contient des cellules, voire des structures tissulaires, issues des 3 feuillets embryonnaires (Zhang *et al.*, 2012a). Il existe également la complémentation tétraploïde. Dans ce cas, les cellules pluripotentes injectées dans le blastocyste hôte ne bénéficient pas de l'environnement de la masse cellulaire interne de l'embryon hôte, les cellules tétraploïdes étant uniquement capables de former le trophoctoderme. Les CS injectées sont donc à elles seules à l'origine d'un organisme entier (Buta *et al.*, 2013). Enfin, la transplantation de CS est le plus souvent décrite pour tester le potentiel souche de cellules adultes qui présentent une prolifération importante aux stades post-embryonnaires, comme les HSCs ou les SSCs. Cela consiste à injecter ces CS préalablement marquées au sein ou à proximité de l'organe receveur d'un embryon ou d'un individu adulte. Des CS sont capables de coloniser l'organe d'intérêt, de proliférer au sein de celui-ci et de se différencier pour générer les différents lignages cellulaires relatifs à l'organe comme la lignée hématopoïétique ou la lignée germinale (Osawa *et al.*, 1996; Yoshizaki *et al.*, 2011).

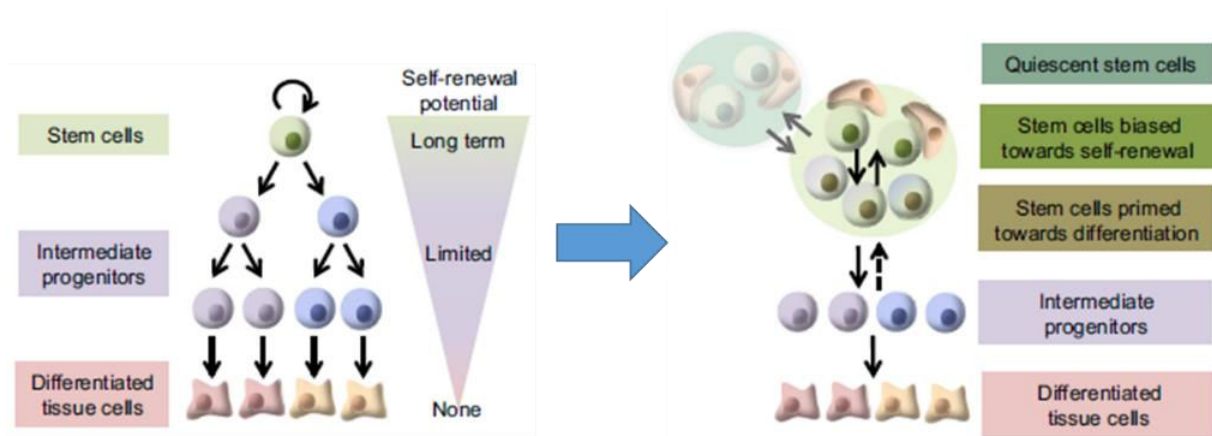


Figure 5 : Les cellules souches adultes sont hétérogènes et présentent des profils hiérarchiques réversibles.

Schéma représentant la plasticité et la dynamique des cellules souches au sein du compartiment de la niche. Un modèle de hiérarchie établi montre que les cellules souches ont une capacité d'autorenouveau à long terme alors que les progéniteurs intermédiaires ont un potentiel plus limité et que les cellules différenciées ont perdu cette capacité (schéma de gauche). Néanmoins, des études plus récentes ont montré une plasticité et une dynamique des cellules souches. Au sein des niches plusieurs catégories de CS ont été identifiées, les cellules souches quiescentes, les CS naïves actives et les CS déjà engagées. Elles présentent une plasticité permettant une interconversion des cellules entre elles. Les progéniteurs intermédiaires issus de la différenciation des CS montrent également une capacité à revenir à l'état souche. Seules les cellules différenciées ne présentent plus cette plasticité (schéma de droite). D'après Krieger & Simons, 2015

Au cours de ces dernières années, le concept de la cellule souche chez les individus adultes, a évolué d'une entité cellulaire discrète vers une fonction biologique avec un degré de plasticité (Figure 5). Cette évolution est liée à la possibilité de marquer les lignages cellulaires et de les suivre en vidéomicroscopie. L'étude des différentes niches de cellules souches adultes (niche intestinale, du follicule pileux, des spermatogonies souches...) a montré une hétérogénéité de la dynamique des cellules souches avec la présence de cellules souches quiescentes, de cellules souches actives avec une activité d'autorenouveau importante et une interconversion des CS quiescentes et actives. De plus, les cellules engagées dans la différenciation comme les cellules souches dites engagées par rapport à un état dit naïf et les progéniteurs, pourraient revenir à un état initial. Le compartiment souche est donc constitué d'une population hétérogène de cellules et la niche modulerait la fonction de ce compartiment en fonction des besoins locaux, systémiques ou des besoins physiologiques. Dans le cas de dommages tissulaires, la réparation tissulaire ou la reconstitution des cellules souches pourrait faire intervenir une dédifférenciation de cellules différenciées. C'est le cas au niveau de la niche intestinale à partir des précurseurs des cellules de Paneth ou encore au niveau de la niche du follicule pileux à partir de cellules épithéliales (pour revue, Krieger and Simons, 2015). Par ailleurs, la caractérisation des différentes CS a permis de déterminer différents marqueurs de cellules souches d'un tissu donné en fonction du développement et de l'état adulte et en fonction de l'état de quiescence ou d'activité des cellules. De même les progéniteurs peuvent être différenciés sur la base de marqueurs. Une revue récente de Tweedell (2017) recense ces marqueurs et les voies de signalisation impliquées dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques, nerveuses, prostatiques, mammaires et intestinales (Tableau 1). Il apparaît des marqueurs communs à différentes cellules souches ou progéniteurs adultes (c-kit, CD 24, CD 44...) et une implication des voies WNT/caténine β et Notch/Delta.

d. La niche des cellules souches, source de molécules à potentiel thérapeutique

Du fait que les cellules souches et les cellules cancéreuses partagent une capacité d'autorenouveau, des chercheurs ont suggéré que les cellules cancéreuses se soient

| CS | Stade | Marqueurs constitutifs | | | Voies de régulation | |
|---------|----------|------------------------------------|---|--|---|----------------------|
| | | Quiescente | Active | Progéniteurs, différenciation | Composants | Fonction |
| HSC | Dévelop. | CHD7 | CXCL-12, SCF | | Wnt, FGF, SDF-1, Notch1, RumX, CDC-HOX, PGE2 | Q,A |
| | Adulte | BMP, OPN, FRP1 | SCF, Flk2, Slamf1. ST HSC : Lin-, Sca1+, Kit+, CD34+, flt3- LT-HSCs : Lin-, Sca1+, Kit+, CD34- flt3- H : Lin-, CD34, CD45RA-, CD38-, CD90 | Sca1+, Flk2, c-kit, Lin-, Slamf1+, CD27, CD34+, IL7RA+, ESAM, NG2, Nestin. H : Lin, c-kit, IL3RA, Cd10+, CD38, CD45RA, CD90, CD334+,CD123, Tie | OPN, BMP, FRP, Wnt/beta catenin, c-myc, Notch Wnt, FGF, SDF-1 Wnt/beta catenin, Notch, Delta II | Q A Df |
| NSC/NCC | Dévelop. | | | Sox2, Pax6, Nestin, GFAP GLT-1, CBP, BLBP, Vimentin | Wnt/catenin, SFF, BMP, RA, FGF | Df |
| | Adulte | CHD7 NSC : LeX Bright | NSC : LeX +, EGFR+ | GLAST, CBP, GFAP, BLBP, GLT1, TGF, FGF, RA, TN-C, RC-1,2, Nestin, Vimentin, GS, Pdgf, NSC : CD24+, EGFR+ | Notch/Delta III, Wnt, Jag1, Ephrin B Wnt/catenin, SHH, TGAF, TFG, PDGF, EGFR | Q Df |
| PrSC | Dévelop. | | Lgr4 | Lgr4, Lin-, Scz1+, CD49 | | A |
| | Adulte | | | kit, CD44, CD133, CD117 CD 138, CD49f, K5, K8, K14,K18, PSA, H : CD133, TROP 2,CD44, CD49f | Alpha 6 Integrin. Wnt, Notch/Delta, Jagged1, SHH H : alpha/beta integrin | Df |
| MaSC | Dévelop. | | | K14,K19 | Wnt | Df |
| | Adulte | Laminin1 | | K5, K8, K14+, K19+, lin-, CD24, CD29+ CD29-,CD49f+ | Notch/Jag. 1, Wnt, Integrins, EGFR, E,P cadherin | Q |
| ISC | Dévelop. | LRC | | Lgr5 | Wnt,SHH,Hox,FGF,TGF | Df |
| | Adulte | Bmi1 H2B, Lgr5-, DCAMKL-1 | Lgr5, Bmi1, Hopx, Sox9 mTert,Lrig1 | Lgr5, Delta II1, Bmi1 | Notch/Delta 1,Wnt-,Wnt+, Wnt+/catenin EGFR | QA Df |

Tableau 1 : Les cellules souches expriment différents marqueurs et sont régulées par différentes voies en fonction de leur type, de leur état au cours du développement et à l'âge adulte.

Tableau représentant l'expression des différents marqueurs ainsi que les voies de signalisation impliquées dans la régulation de différents types de cellules souches pendant le développement et à l'âge adulte. CS : cellules souches, HSC : cellules souches hématopoïétiques, NSC/NCC : cellules souches neurales/ précurseurs de la crête neurale, PrSC : cellules souches de la prostate, MaSC : cellules souches mammaires, ISC : cellules souches intestinales. **H**: human. LT HSC: long term HSC, ST: Short term HSC. D'après Tweedell, 2017, Yang *et al.*, 2005, Daynac *et al.*, 2015, Umar, 2010, Metcalfe *et al.*, 2014.

appropriées la machinerie d'auto-renouveaulement qui est normalement présente chez les cellules souches. En effet, certaines études proposent que les cellules souches soient à l'origine des cellules cancéreuses (Sell, 1993, 2004) et que la variation des risques de cancers à travers les tissus peut être expliquée par le nombre de divisions des cellules souches du tissu (Tomasetti *et al.*, 2016). De surcroit, dans une cellule souche adulte saine, les voies de régulation de l'autorenouveaulement, de la prolifération et de la survie sont régulées de façon fine pour maintenir l'homéostasie et l'architecture cellulaire. En revanche, dans la cellule cancéreuse, ces mêmes voies sont souvent dérégulées et des facteurs permettant l'autorenouveaulement des cellules souches participent à l'induction et/ou l'amplification de la transformation. Ainsi, plusieurs voies de régulation qui sont classiquement associées aux cellules souches, sont également associées aux cellules cancéreuses comme la voie Wnt, la voie Sonic Hedgehog (Shh) ou encore la voie Notch (Figure 6). Par exemple, lorsque la voie Wnt qui contribue au développement embryonnaire de nombreux organismes (Cadigan and Nusse, 1997) est dérégulée, elle peut contribuer au développement de cancers gastrointestinaux (White *et al.*, 2013). Parmi les facteurs dérégulés, beaucoup sont spécifiques des cellules souches et sont retrouvés surexprimés. On retrouve notamment des facteurs de transcription tels que Sall4, POU5F1 ou Sox2 qui sont surexprimés dans le cancer du testicule, de la prostate et du poumon, respectivement (Linn *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011). Des récepteurs membranaires comme GFR α 1 et RET sont également surexprimés dans le cancer du sein (Morandi and *al.*, 2013). La prolifération et la différenciation des cellules souches sont à la fois contrôlées par des facteurs intrinsèques et extrinsèques à la niche. Dans le cas de la niche des spermatogonies souches qui sera détaillée dans le paragraphe 2-e, il peut être mentionné que l'expression d'Oct4 (POU5F1) peut être régulée par l'IGF1 sécrétée par les cellules de Leydig et que les concentrations de GDNF, sécrété par les cellules de Sertoli, doivent être finement régulées afin de permettre la prolifération des SSCs sans induire la formation de tumeurs séminales, ni induire une perte des cellules germinales (Meng *et al.*, 2001).

e. Applications

Les cellules souches peuvent servir de modèle pour l'étude des différents processus de maladies génétiques tissulaires ou cellulaires afin de mieux comprendre leurs origines

Les cellules souches

Les tumeurs

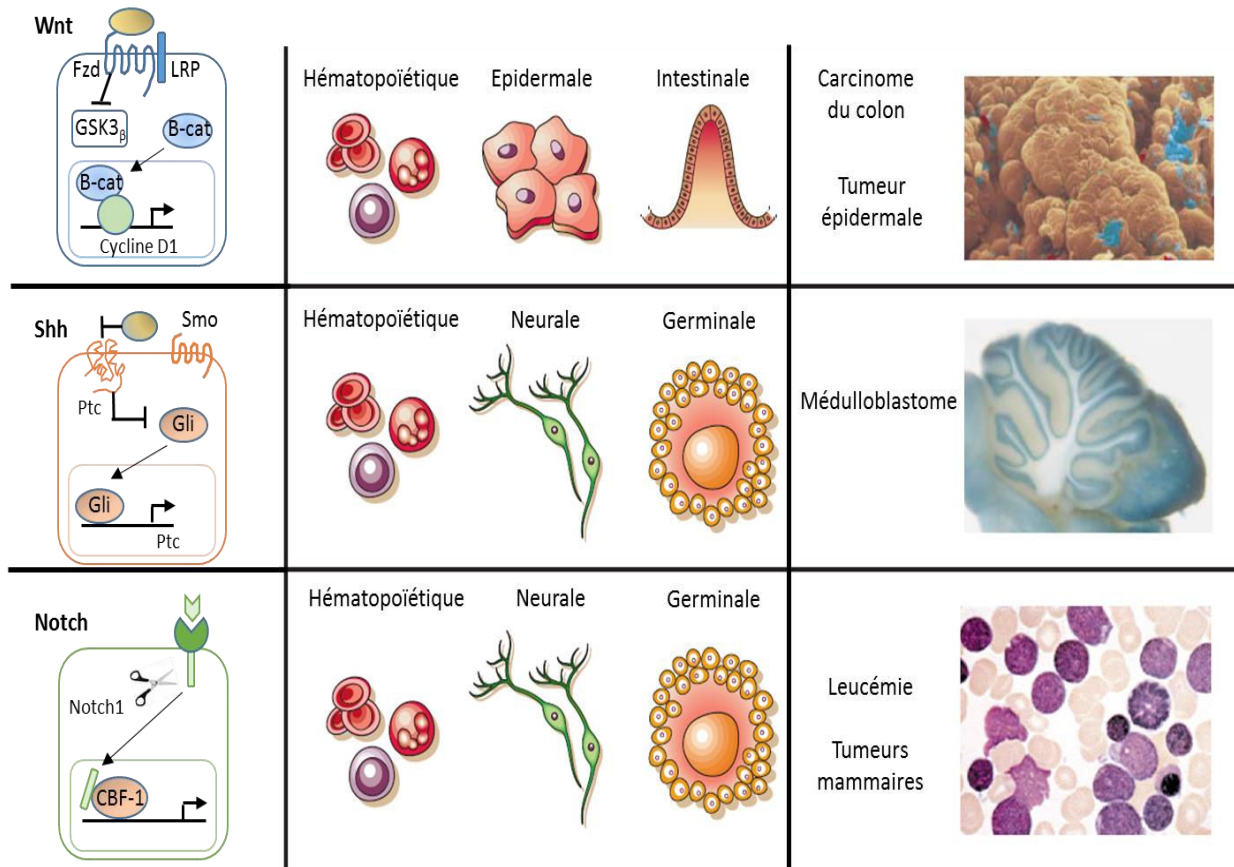


Figure 6 : Schéma représentant les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'auto-renouvellement des cellules souches et dont la dérégulation peut induire des tumeurs.

Les voies Wnt, Sonic hedgehog (Shh) et Notch contribuent toutes à l'auto-renouvellement des cellules souches dans de nombreux organes tels que les systèmes hématopoïétiques, le système nerveux ou la lignée germinale. Néanmoins, lorsque ces voies sont dérégulées elles contribuent au développement de cancers tels que des carcinomes, des médulloblastomes ou encore des leucémies. D'après Reya *et al.*, 2001

(Park *et al.*, 2008). En effet, il est souvent difficile d'obtenir des cellules endommagées chez un patient afin de pouvoir étudier leur comportement et les mécanismes à l'origine de la maladie. Des iPS générées à partir d'un patient porteur d'un gène défectueux, présentent donc une alternative non négligeable dans l'étude des maladies géniques. De plus, la transplantation de cellules souches de type ES, préalablement génétiquement modifiées pour inactiver un ou plusieurs gènes, dans la masse cellulaire interne d'un blastocyste permet d'obtenir des souris qui porteront la mutation introduite (Eckardt *et al.*, 2011). La génération F1 de ces chimères qui présentera le gène muté pourra alors simuler la maladie et être étudiée en laboratoire. Le même type d'approche peut également être réalisé sur des cultures de cellules souches génétiquement modifiées notamment dans le but de limiter l'expérimentation sur les animaux. Les cellules souches, comme les cellules souches stromales mésenchymateuses peuvent aussi être utilisées en médecine régénérative notamment dans le traitement de brûlures graves (pour revue, Ghieh *et al.*, 2015), les HSCs sont déjà utilisées dans le rétablissement du système sanguin chez des patients atteints de leucémie (Goldman *et al.*, 1988). Des études sont actuellement en cours pour évaluer le potentiel des CS dans le remplacement des cellules endommagées dans d'autres maladies. En effet, elles pourraient offrir une source inépuisable de cellules et de tissus pour remplacer et traiter des maladies comme Parkinson, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), des maladies cardiaques ou encore le diabète (Larijani *et al.*, 2012). Les cellules pluripotentes induites (iPS) font désormais partie intégrante des nouvelles technologies thérapeutiques telles que les patches cellulaires (Lalit *et al.*, 2014) et elles peuvent être re-différenciées en cellules ou tissus d'intérêt. L'avantage des iPS au niveau thérapeutique est qu'elles peuvent être issues du patient à traiter et donc limiter le rejet de la greffe contrairement aux xéno greffes de cellules ES. Les SSCs, en particulier, présentent un intérêt pour préserver la fertilité de garçons prépubères soumis à des traitements anti-cancéreux gonadotoxiques alors qu'ils ne peuvent pas encore fournir du sperme à cryopréserver (Ginsberg, 2011). La conservation puis la transplantation ultérieure des SSCs semble alors une solution prometteuse.

Enfin, les cellules souches sont aussi proposées pour la sauvegarde d'espèces en danger. Par exemple chez le rhinocéros *Ceratotherium simum cottoni* et le primate *Mandrillus leucophaeus*, deux espèces en voie de disparition, des iPS ont été créées afin d'augmenter la diversité génétique et de limiter l'homozygotie souvent délétère (Ben-Nun *et al.*, 2011). Un

avantage des CS est qu'elles peuvent être cryopréservées. Cela est particulièrement intéressant en ce qui concerne les SSCs du fait qu'elles peuvent générer des gamètes et de ce fait assurer une descendance comme décrit chez la souris ou le tilapia du Nil (Lacerda *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012).

2. Les cellules souches spermatogoniales

a. Les spermatogonies à la base de la spermatogenèse

Les spermatogonies sont des cellules diploïdes à la base de la spermatogenèse et vont permettre de par leur multiplication et leur différenciation d'obtenir des cellules haploïdes hautement spécialisées. Malgré des anatomies testiculaires et des niveaux de complexité différents, le processus de spermatogenèse est extrêmement conservé à travers les espèces. Trois grandes phases caractérisent la spermatogenèse : la prolifération des spermatogonies, la méiose et la spermiogenèse. Lors de la première phase, les cellules spermatogoniales souches (SSCs) se divisent de façon symétrique ou asymétrique pour garder un pool de SSCs (capacité d'auto-renouvellement) mais aussi générer par différenciation, des spermatogonies qui à leur tour prolifèrent et se différencient en spermatocytes primaires pré-leptotène. Pendant la phase de méiose, ces cellules diploïdes vont générer des cellules haploïdes par une division réductionnelle suivie d'une division équationnelle, afin de produire successivement des spermatocytes secondaires haploïdes et de petite taille par rapport aux spermatocytes primaires, puis des spermatides rondes. Enfin, la phase de spermiogenèse consiste en la différenciation des spermatides rondes en spermatides allongées avec le développement du flagelle, de l'acrosome, la réorganisation de la chromatine et la condensation nucléaire. Mais également la réorganisation du cytoplasme avec, notamment, la mise en place du manchon mitochondrial au niveau de la pièce intermédiaire et l'élimination du cytoplasme excédentaire sous la forme de corps résiduels. Cela confère à ces cellules hautement spécialisées une capacité de motilité pour assurer leur fonction d'apport du matériel génétique d'origine paternelle au gamète femelle. Le maintien d'une population de cellules souches, le contrôle de leur prolifération et de leur différenciation sont donc primordiaux pour assurer un bon équilibre dans la production des gamètes chez le mâle. Lors des différentes mitoses, la cytodiérèse incomplète sera à l'origine de ponts cytoplasmiques entre les spermatogonies. Ils permettent le partage de produits géniques et la synchronisation du développement des cellules germinales issues d'une même cellule souche (pour revue, De Rooij et Russell, 2000). Suite aux deux divisions méiotiques, les spermatides haploïdes sont toujours interconnectées

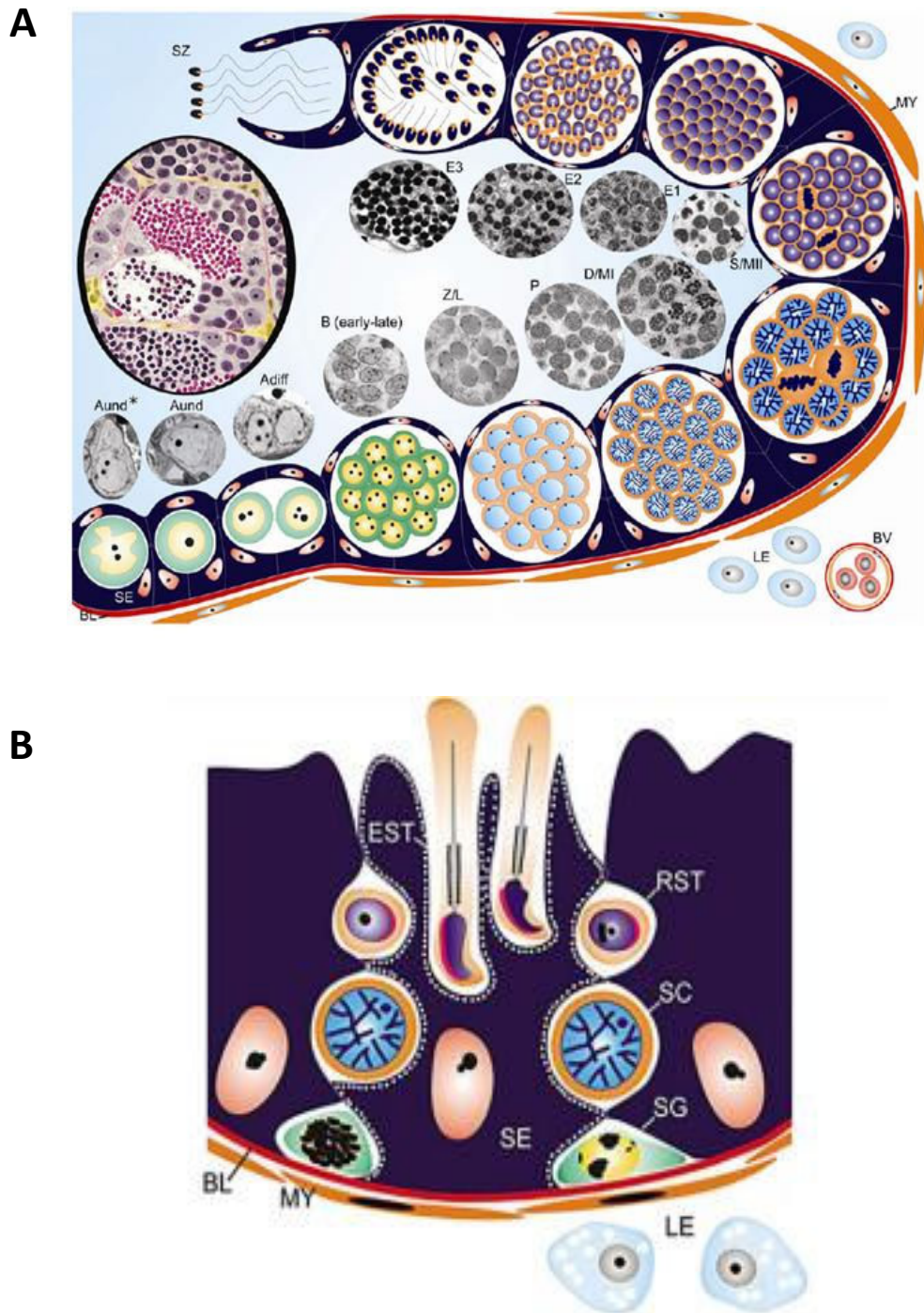


Figure 7 : Organisation testiculaire cystique et non cystique

A. Schéma représentant un testicule avec une organisation cystique. Au sein d'un cyste délimité par des cellules de Sertoli, des clones de cellule germinale se différencient de façon synchrone. Les spermatozoïdes sont par la suite libérés dans la lumière du lobule. BV : vaisseau sanguin, LE : cellules de Leydig, MY : cellule myoïde, SE : cellule de Sertoli. Schéma issu de Schultz *et al.*, 2010. **B.** Schéma un tube séminifère de souris. Les SSC se situent au contact de la lame basale et l'onde spermatique est centripète. EST : spermatide allongée, RST : spermatide ronde, SC : spermatocyte, SG : spermatogonie, SE : cellules de Sertoli, BL : lame basale, MY : cellule myoïde, LE : cellules de Leydig. D'après França *et al.*, 2016.

entre elles et lors de la spermiation, la rupture des ponts cytoplasmiques engendre l'individualisation des spermatides matures.

b. Organisations testiculaires

Le testicule s'organise en deux compartiments bien distincts : le compartiment interstitiel et le compartiment séminifère. Le compartiment interstitiel contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les cellules de Leydig stéroïdogènes regroupées en amas, des cellules immunitaires, les mastocytes et les macrophages, et également des terminaisons nerveuses. Deux types d'organisation de l'épithélium séminifère ont été décrites chez les Vertébrés : l'organisation cystique observée chez les Anamniotes comme les poissons Téléostéens et les Amphibiens, et l'organisation non cystique présente chez les Amniotes, comme les Reptiles, les Oiseaux ou encore les Mammifères (Schulz *et al.*, 2010a; França *et al.*, 2016) (Figure 7). Le compartiment séminifère comprend les cellules de Sertoli associées aux cellules de la lignée germinale (GC) et se présente sous la forme de tubes séminifères chez les Amniotes. Ces tubes sont délimités par une membrane basale et des cellules péritubulaires myoïdes. Ils présentent une lumière qui débouche dans le *rete testis* qui se prolonge par les canaux efférents puis par le canal de l'épididyme. Au sein des tubes séminifères, les cellules de Sertoli polarisées forment des jonctions spécialisées entre elles qui constituent l'un des éléments de la barrière hémato-testiculaire (Cheng and Mruk, 2012). Ces jonctions qui divisent le tube séminifère en deux parties distinctes : le compartiment basal où résident les spermatogonies et le compartiment adluminal occupé par les spermatocytes et les spermatides. L'onde spermatogénétique est centripète. L'organisation non cystique est caractérisée par l'association d'une cellule de Sertoli, qui s'étend depuis la lame basale jusqu'à la lumière du tubule, avec des cellules germinales à des stades de différenciation différents. Les cellules de Sertoli ne prolifèrent plus après la puberté, constituant ainsi un stock permanent nécessaire au soutien de la spermatogenèse chez l'adulte. L'organisation cystique est caractérisée par l'association initiale d'une cellule de Sertoli et d'une spermatogonie et de leur évolution conjointe au cours de la spermatogenèse, conduisant à l'association de cellules de Sertoli à des clones de cellules germinales, ces dernières étant à un même stade de développement (Figure 7). Chez les Actinoptérygiens, plusieurs cystes qui peuvent être à des stades différents

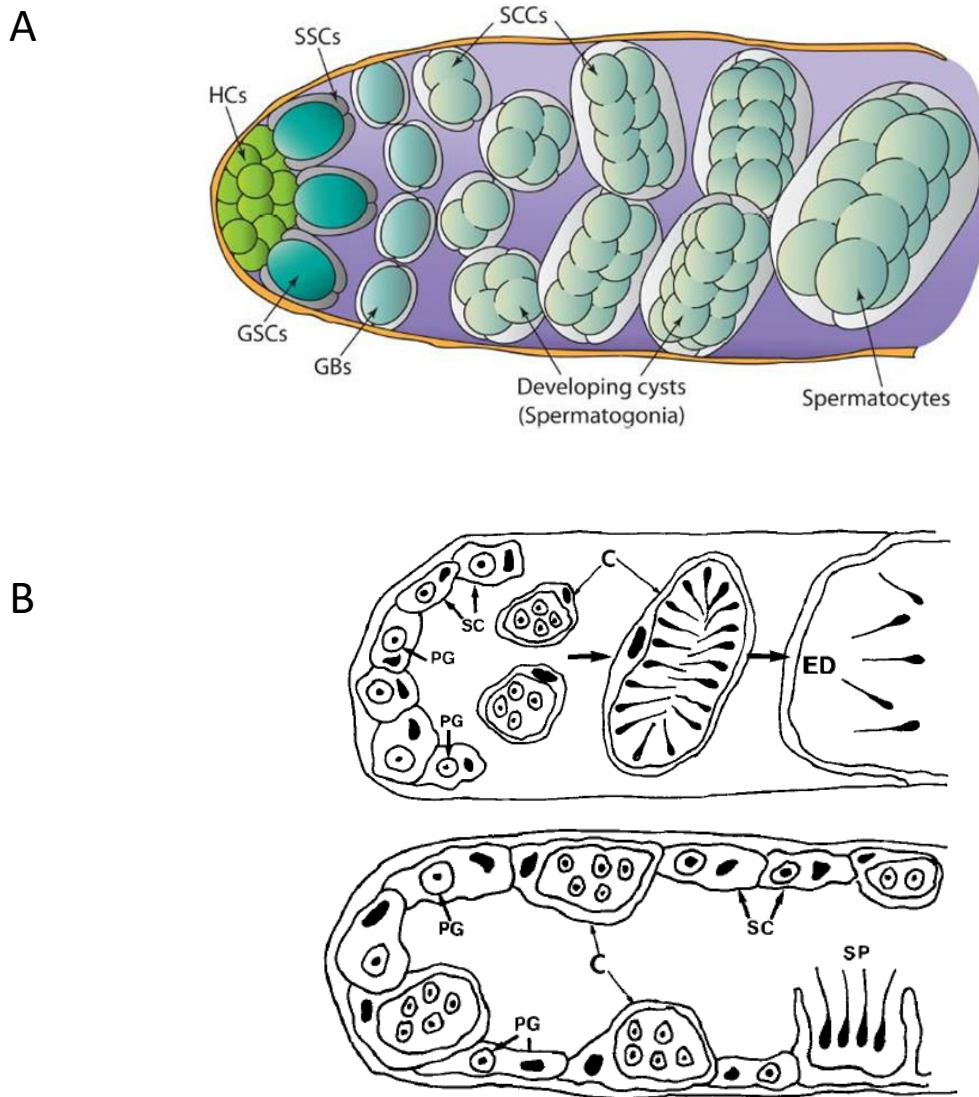


Figure 8 : Les SSCs peuvent être réunies dans une région testiculaire.

A : Chez la drosophile, les GSCs sont réunies à un pôle du testicule, au contact de la niche appelée hub (HC). HCs : cellules du hub ; SSCs : cellules souches somatiques ; GSCs : cellules souches germinales ; GBs : gonialblaste. (La Marca et Somers, 2014). **B** : Chez les poissons, les spermatogonies (PG) sont réunies au fond des lobules des testicules de type restreint, alors qu'elles sont distribuées tout le long des lobules non restreints. SC : cellule de Sertoli, SP : spermatozoïdes, C : cystes, ED : canaux efférents (Pudney, 1995).

de la spermatogenèse sont regroupés dans des lobules testiculaires de type non restreint ou des tubules testiculaires. Dans ces types de testicule, les cystes sont dépourvus de lumière et ne migrent pas au cours de leur développement. Les cellules germinales se différencient de façon synchrone au sein des cystes distribués autour de la lumière centrale du tube, ou lobule, dans laquelle sont libérés les spermatozoïdes après rupture du cytoplasme des cellules de Sertoli. Ils rejoignent ensuite un canal collecteur longitudinal dorsal de la gonade (pour revue, Schulz *et al.*, 2010). Afin de permettre la formation de nouveaux cystes, les cellules de Sertoli doivent donc garder leur capacité de prolifération tout au long de la vie d'un individu (Schulz *et al.*, 2005a). En effet, que la formation de nouveaux cystes soit saisonnière comme chez le saumon atlantique (Taranger *et al.*, 1999) ou continue comme chez le poisson-chat africain (Schulz *et al.*, 2005b), le maintien de la prolifération des cellules de Sertoli après la puberté est primordial pour générer les futurs cystes.

Chez certains Anamniotes, une polarisation testiculaire peut également être retrouvée. Chez des organismes modèles comme la drosophile *D. melanogaster*, le testicule est également organisé en cystes et est constitué d'un ensemble de filaments testiculaires. L'onde spermatogénique est linéaire et s'effectue de l'extrémité distale, où les cystes sont formés, vers l'extrémité proximale où les spermatozoïdes seront libérés dans le tractus mâle. Les cellules souches spermatogoniales sont localisées à l'extrémité apicale des filaments testiculaires et au contact des cellules somatiques du hub (Figure 8). Elles se divisent de façon asymétrique afin de maintenir le pool de cellules souches germinales et de générer des progéniteurs appelés gonialblastés (GBs) qui s'engagent dans la voie de différenciation (pour revue, Demarco *et al.*, 2015). Deux cellules cystiques entourent alors le GB pour former un cyste qui va commencer sa migration vers l'extrémité proximale du filament. Le GB, qui a perdu contact avec les cellules du hub, se divise par mitoses successives, quatre au total, pour générer un cyste de 16 spermatogonies filles. La polarisation testiculaire est également retrouvée chez les poissons de la famille des Athérinomorpes (pour revue, Uribe *et al.*, 2014) qui ont des testicules lobulaires de type restreint. Les spermatogonies indifférenciées sont localisées au fond des lobules, à proximité de l'albuginée. Ces lobules présentent une polarisation où les cystes migrent au cours de la spermatogenèse de la périphérie vers le centre du lobule où les spermatozoïdes rejoignent des canaux efférents. L'onde spermatique est donc centripète au sein du lobule (pour revue, Schulz *et al.*, 2010) (Figure 8).

c. Caractérisation structurale des spermatogonies chez différentes espèces

Initialement, les différentes populations de spermatogonies ont été distinguées sur la base de leur morphologie, notamment nucléaire, et de leur position au sein de l'épithélium germinale. Les spermatogonies indifférenciées présentent des noyaux avec peu d'hétérochromatine et peuvent être retrouvées isolées, elles sont alors nommées A_{single} (A_s), en paire (A_{pr}) ou alignées dans un syncytium et nommées A_{al} (al pour *aligned*). Chez les rongeurs et selon le modèle dit « A_s », modèle initial maintenant controversé (voir chapitre « La dynamique du compartiment souche »), le potentiel souche était attribué aux spermatogonies isolées capables de s'autorenouveler et de donner des générations successives de spermatogonies indifférenciées reliées par les ponts intercytoplasmiques (SPG A_{pr} ; A_{al4} à A_{al16} par exemple) et qui peuvent être également apparentées à des progéniteurs. Toujours selon ce modèle initial, la dernière génération de SPG_{al} se différencierait, sans mitose supplémentaire, pour donner la première génération de spermatogonies différenciées, les spermatogonies A1. Ensuite, la phase de prolifération mitotique donne successivement les spermatogonies A2, A3, A4, intermédiaires (Int) et les spermatogonies B. Ces dernières, après une dernière mitose, donnent les spermatoctes pré-leptotènes (SPC PL). Le nombre de mitoses spermatogoniales conduisant à la production de spermatoctes pré-leptotène varie selon les espèces, (5 chez le poisson zèbre, 11 chez la souris). Ainsi, le nombre de sous-populations de spermatogonies caractérisées chez les différentes espèces est variable et différentes nomenclatures ont été adoptées, ce qui complique les approches comparées inter-espèces. Néanmoins, on distingue de façon générale les spermatogonies indifférenciées, incluant les SSCs, des spermatogonies différenciées.

Les spermatogonies indifférenciées

Les spermatogonies indifférenciées ont été caractérisées chez de nombreuses espèces comme étant des cellules de grande taille accolées à la lame basale avec un noyau volumineux de forme irrégulière et pauvre en hétérochromatine (Rowley *et al.*, 1971; Chiarini-Garcia and Russell, 2002; Leal *et al.*, 2009).

Des spermatogonies indifférenciées ont été décrites chez tous les Vertébrés, mais cette catégorie de cellules est constituée d'un nombre variable de sous-classes en fonction des

espèces. Chez le poisson-zèbre, seulement 2 types de spermatogonies indifférenciées ont été caractérisées (les A_{und}* et les A_{und}) et présentent un ou deux nucléoles (Leal *et al.*, 2009). Chez la souris, la présence d'un nucléole compact a également été décrite en plus de l'absence d'hétérochromatine contre l'enveloppe nucléaire et l'aspect marbré du noyau (Chiarini-Garcia and Russell, 2002; Loppion *et al.*, 2008). Chez l'homme, seuls trois types de spermatogonies sont différenciables, les A_{dark}, A_{pale} et les B. Contrairement aux autres espèces, le noyau des spermatogonies indifférenciées, les A_{dark}, présente un contour régulier et le nucléole est situé à la périphérie, au niveau de la lamina nucléaire. Au niveau des A_{pale}, le nucléole se distingue du stade précédent par un centre fibrillaire (zone amorphe) développé (Rowley *et al.*, 1971).

Au niveau cytoplasmique, il peut être également noté la présence d'un matériel cytoplasmique dense, le nuage. Le nuage se présente comme un matériel dense classiquement retrouvé dans les cellules germinales et est de composition similaire au plasme germinatif. Il peut avoir des appellations différentes selon les organismes ou son évolution structurale (granule polaire chez la drosophile, granule P chez le nématode *C. elegans* ; corps de Balbiani chez les amphibiens, corps chromatoïde ou ciment intermitochondrial chez les Mammifères). Chez les poissons il est par exemple retrouvé dans les spermatogonies indifférenciées de tilapia du Nil (pour revue, Schulz *et al.*, 2010a), d'anguille *Synbranchus marmoratus* (Nostro *et al.*, 2003) ou encore de poisson chat *Pseudoplatystoma fasciatum* (Batlouni *et al.*, 2006). Ce matériel cytoplasmique est composé de ribonucléoprotéines et d'ARNm stockés comme par exemple les ARNm Vasa et les ARNm Piwi qui sont spécifiques du lignage germinatif (Knaut *et al.*, 2000; Houwing *et al.*, 2007; Onohara and Yokot, 2012). Enfin le nuage est souvent associé aux mitochondries, à l'appareil de Golgi ou encore au noyau avec lequel il communique de par les pores nucléaires (Parvinen and Jokelainen, 1974). Ces multiples associations et la mise en évidence d'échanges entre le nuage et les autres organelles suggèrent donc un rôle important du nuage dans la régulation de la spermatogenèse. Enfin, toujours au niveau cytoplasmique, la présence de mitochondries en grand nombre a été observée dans les spermatogonies indifférenciées chez le tilapia du Nil (pour revue, Schulz *et al.*, 2010). Chez la souris où elles sont volumineuses (Chiarini-Garcia and Russell, 2002) et chez l'homme où elles sont regroupées et connectées entre elles (Rowley *et al.*, 1971).

Les spermatogonies différenciées

Les spermatogonies différenciées sont caractérisées par une taille généralement inférieure aux spermatogonies indifférenciées et une quantité plus importante en hétérochromatine (de Rooij and Russell, 2000). Selon les espèces, différentes sous-populations de spermatogonies différenciées ont été identifiées sur la base de caractères histologiques ou ultrastructuraux. Chez la souris, comme introduit au début de ce paragraphe, 4 types de spermatogonies différenciées de type A (SPG A₁, SPG A₂, SPG A₃ et SPG A₄) peuvent être distinguées. Les A₁ présentent très peu d'hétérochromatine associée à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire alors que pour les A₄, de 25 à 40% de la surface interne de l'enveloppe est associée à de l'hétérochromatine (Chiarini-Garcia and Russell, 2002). La quantité d'hétérochromatine associée à l'enveloppe est la plus importante pour les spermatogonies intermédiaires, de 40 à 90% de la surface. La présence d'une hétérochromatine conséquente au niveau de la bordure nucléaire est également retrouvée dans les trois sous-populations de spermatogonies de type A chez le poisson-zèbre (Leal *et al.*, 2009). Dans le cytoplasme des spermatogonies de type A chez la souris, il est également noté la présence de mitochondries de grande taille ($\varnothing = 0,60 \mu\text{m}$), qui atteignent une taille maximale ($\varnothing = 0,69 \mu\text{m}$) dans les SPG A₂ puis leur taille diminue jusqu'au stade SPG Int ($\varnothing = 0,47 \mu\text{m}$) (Chiarini-Garcia and Russell, 2002). Au niveau nucléaire, un nucléole compact est également observé dans les SPG A₁, puis ce dernier est plus étendu dans les SPG A₂ (Chiarini-Garcia and Russell, 2002).

Le nombre de spermatogonies de type B (SPG B) discernables varie également en fonction des espèces. Chez le poisson-zèbre, deux types de SPG B ont été décrites, les SPG B précoces et tardives (B_{early} et les B_{late}), alors que chez le tilapia du Nil, elles sont au nombre de 7 (B₁ à B₇) (Schulz *et al.*, 2005c; Leal *et al.*, 2009). Chez ces deux espèces, ce sont des cellules de petite taille avec un petit noyau composé d'une hétérochromatine dense. On peut également souligner chez le poisson-zèbre que la morphologie nucléaire diffère avec un noyau ovale pour les SPG B_{late} et rond pour les SPG B_{early} (Leal *et al.*, 2009). Chez la souris, les SPG B sont caractérisées par une diminution de l'hétérochromatine au niveau nucléaire (25-45% vs 40-90% dans les SPG Int), une diminution des mitochondries, et une compaction de la zone fibrillaire (*pars fibrosa*) du nucléole (Chiarini-Garcia and Russell, 2002). Chez l'homme, les SPG B ont une forme de poire avec un noyau sphérique contenant un nucléole central et les mitochondries sont individualisées (Rowley *et al.*, 1971).

Malgré des critères morphologiques distincts, il reste encore difficile chez certaines espèces d'identifier tous les types de spermatogonies présentes au niveau testiculaire. Chez la souris, les SSCs ne représentent qu'un faible pourcentage du nombre de cellules germinales totales, environ 0,03% (Tegelenbosch and De Rooij, 1993), il est donc d'autant plus difficile de les localiser. De ce fait, il semble primordial de ne pas limiter leur caractérisation à des critères morphologiques. Récemment, les avancées moléculaires ont permis l'identification de marqueurs spécifiques de certaines sous-populations de spermatogonies permettant une caractérisation plus fine de ces cellules.

d. Caractérisation moléculaire des SSCs

Longtemps considérées comme des cellules unipotentes du fait qu'elles ne soient capables de générer qu'un seul type de cellules *in vivo*, des études ont montré le potentiel pluripotent des SSCs (Azizi *et al.*, 2016). Cependant on peut noter, que cette pluripotence semble être âge dépendante car si des SSCs issues de souris au stade post-natal ou âgées de moins de 7 semaines permettent de générer des tératomes, ce n'est pas le cas pour des SSC issues de testicules de souris âgées de plus de 7 semaines (Azizi *et al.*, 2016). Néanmoins les cellules souches spermatogoniales expriment des marqueurs conservés de cellules souches tels que Nanog, POU2/Pou5f1 (Oct4) ou encore Sox2 (Bai *et al.*, 2016).

Nanog

La protéine Nanog est constituée d'un homéo-domaine conservé qui se lie à l'ADN au niveau des séquences TAATGG ou CATT (Loh *et al.*, 2006; Jauch *et al.*, 2008). Elle est classiquement associée à Oct4 et Sox2 dans le maintien du caractère pluripotent chez de nombreuses cellules souches. Néanmoins l'expression du gène Nanog dans les SSCs diverge. Ainsi, il ne semble pas être exprimé dans les SSCs en culture (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005) en revanche il est retrouvé *in vivo* chez la souris avec des profils d'expression âge-dépendant, les SSCs néonatales exprimant davantage Nanog que les SSCs adultes (Azizi *et al.*, 2016). Même si Nanog a été décrit comme essentiel pour induire la différenciation des PGCs en cellules germinales au niveau des crêtes génitales pendant le développement embryonnaire

(Chambers *et al.*, 2007), il a été montré que la différenciation des PGCs en SSCs nécessite une diminution de l'expression de Nanog (Oatley and Brinster, 2008).

Pou5f1/Oct4

Cette protéine fait partie de la classe des facteurs de transcription octamères comprenant également les protéines Pit et Unc, capables de reconnaître des sites d'ADN de huit paires de bases présentant une séquence consensus ATGCAAAT (Chambers and Tomlinson, 2009). Oct4 interagit avec l'ADN via 2 homéo-domaines, un homéo-domaine de faible affinité POU spécifique (POU_S) et un domaine de plus forte affinité (POU_{HD}) (Klemm and Pabo, 1996). Oct4 est impliqué dans l'autorenouveau des SSCs chez la souris et il a également été décrit qu'une diminution de son expression par l'acide rétinoïque engendre la différenciation des SSCs en cellules pré-méiotiques (Dann *et al.*, 2008).

Sox2

Sox2 fait quant à lui partie de la super famille des protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN de type *High mobility group* (HMG). Il interagit avec l'ADN au niveau de la séquence consensus A/T A/T CAAAG (pour revue, Bowles *et al.*, 2000). Il a été montré que les cellules Sox2⁺ étaient capables à la fois d'auto-renouveau mais également de se différencier en progéniteurs afin de générer toute une lignée germinale (Arnold *et al.*, 2011). Cependant même si les ARNm de Sox2 sont retrouvés dans les SSCs chez la souris, son expression protéique et sa fonction dans les SSCs n'a pas encore été explicitement déterminée (pour revue, Kim and Belmonte, 2011).

En plus des facteurs de transcription liés à la pluripotence, et communs à différents types de cellules souches, les SSCs expriment aussi d'autres marqueurs tels que VASA (Altman *et al.*, 2014), LIN28, (Zheng *et al.*, 2009) ou encore la protéine PLZF (*Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger*) (Buaas *et al.*, 2004; Costoya *et al.*, 2004). Ces marqueurs ont des profils d'expression variables selon les espèces, ce qui rend difficile la distinction entre les SSCs et leurs progéniteurs. En effet, dans certains cas, ils partagent des caractéristiques moléculaires communes. Par exemple, Plzf est exprimé dans les spermatogonies A_S, A_{pr} et A_{al}

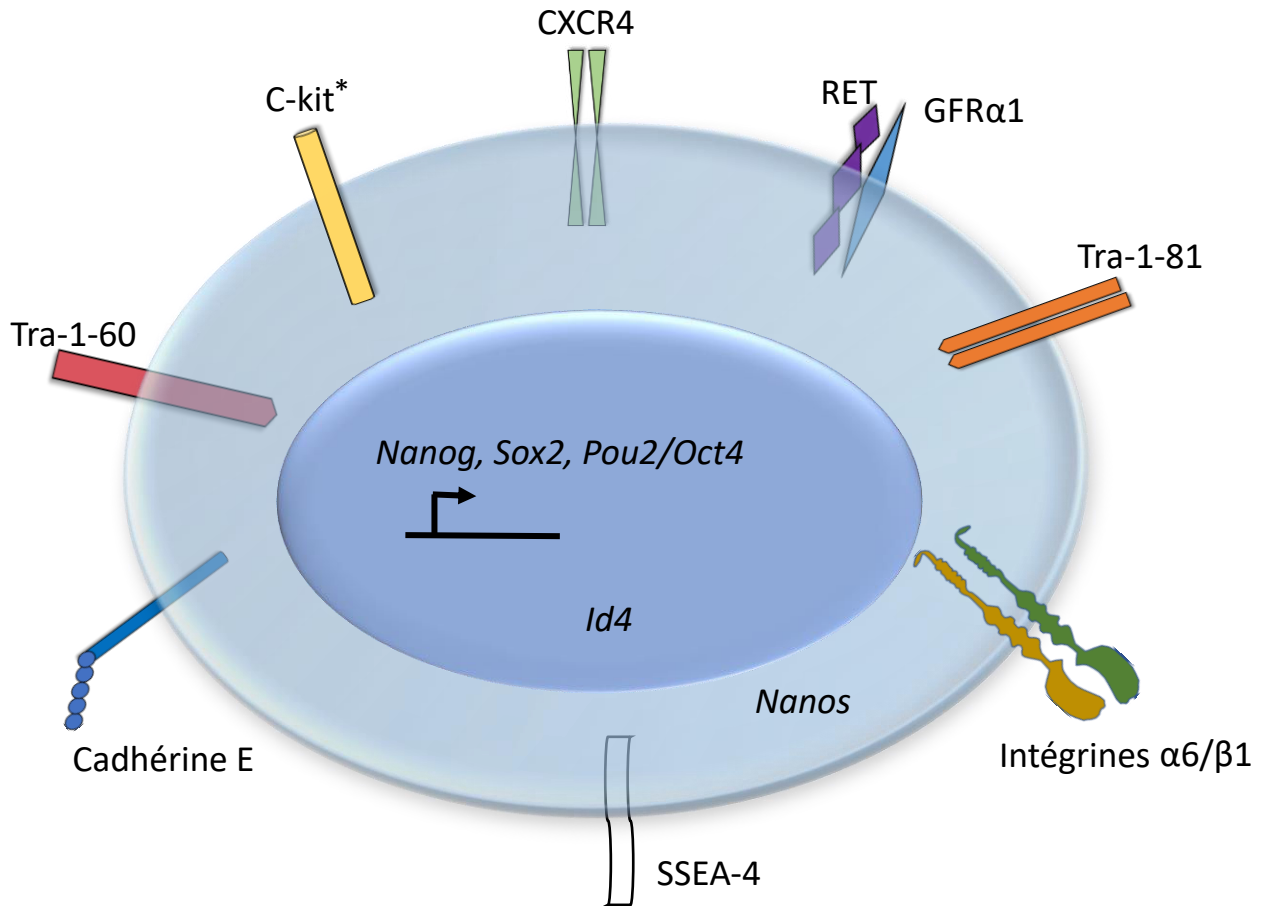


Figure 9 : Synthèse de marqueurs spécifiques de cellules souches spermatogoniales.

Les cellules souches spermatogoniales expriment à la fois des marqueurs souches mais également des marqueurs qui leur sont propres au niveau testiculaire. Ce schéma résume les marqueurs les plus communément utilisés pour identifier les SSCs. Il s'agit de marqueurs membranaires, dont des molécules d'adhésion, et des facteurs de liaison à l'ADN ou aux ARNs régulant l'expression génique. * présent ou absent en fonction des espèces.

chez la souris (Singh *et al.*, 2011). La recherche d'un marqueur ou d'une combinaison de marqueurs spécifiques des SSCs est un challenge d'actualité même dans les espèces modèles. Différentes molécules de surface, qu'elles soient des récepteurs de facteurs de croissance ou des molécules d'ancrage et différents facteurs cytoplasmiques ou nucléaires comme les facteurs de transcription, sont classiquement utilisés comme marqueurs des SSCs (Figure 9).

SSEA1 et SSEA4

Les antigènes des stades embryonnaires 1 et 4 (SSEA1 et 4) sont généralement fortement exprimés à la surface des SSCs. Ce sont des glycosphingolipides, dont le rôle au sein des cellules souches n'a pas encore été décrit. SSEA4 est souvent utilisé comme marqueur membranaire pour l'isolement des SSCs par cytométrie en flux. C'est l'un des rares marqueurs à être exprimé dans les gonocytes, les pré-spermatogonies, et les cellules souches spermatogoniales testiculaires humaines des stades fœtaux jusqu'à l'individu adulte (Altman *et al.*, 2014). SSEA1 est également exprimé dans des SSCs de carpe cultivées *in vitro* (Panda *et al.*, 2011). Ainsi, SSEA1 et SSEA4 peuvent être utilisés dans l'isolement des SSCs par tri cellulaire à partir d'un extrait testiculaire (Powell *et al.*, 2012).

TRA1-60 et TRA1-81

Les antigènes de rejet de tumeur (TRA) 1-60 et 1-81 sont des molécules de type mucine O-glycane exposées à la surface de la membrane cellulaire. Ils sont présents dans de nombreuses cellules souches pluripotentes comme les cellules souches embryonnaires ou encore les cellules germinales primordiales. Alors qu'aucun de ces deux antigènes ne semble être exprimé dans les spermatogonies chez l'humain (Müller *et al.*, 2008), chez le macaque, les spermatogonies expriment Tra-1-81 mais pas Tra 1-60 (Müller *et al.*, 2008). En revanche, les deux antigènes sont exprimés dans les testicules de marmouset (Müller *et al.*, 2008). Il y a donc une variation de l'expression de ces antigènes dans les spermatogonies qui est dépendante de l'espèce. Cependant, le rôle de ces antigènes dans les spermatogonies n'a pas encore été caractérisé.

GFRa1 et RET

Le récepteur GFRa1 (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Family Receptor alpha 1*) et son co-récepteur tyrosine kinase RET (REK) régulent la survie, la prolifération et la différenciation des SSCs (He *et al.*, 2007). La liaison de son ligand, le GDNF, active par le biais de son co-récepteur RET, différentes voies de transduction comme la voie AKT ou la voie des MAPK (Takahashi, 2001). GFRa1 comme RET sont des marqueurs de SSCs très conservés au sein des Vertébrés, ils sont retrouvés chez différentes espèces comme le tilapia du Nil ou la souris (Naughton *et al.*, 2006; Santos Nassif Lacerda *et al.*, 2013).

CXCR4

Le récepteur aux chimiokines C-X-C de type 4 (CXCR4) est un récepteur couplé aux protéine G qui a été notamment caractérisé pour son implication dans la migration des PGCs par interaction avec son ligand SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor1*) aussi appelé CXCL12 (Doitsidou *et al.*, 2002). En plus d'être exprimé dans les PGCs, CXCR4 est également exprimé dans les SSCs des testicules postnataux de souris où le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle important dans leur maintien *in vivo*, et leur prolifération et différenciation *in vitro* (Yang *et al.*, 2013). En effet, l'absence de CXCR4 *in vitro* induit une diminution des ARNm de *Fgf2* impliqués dans la suppression de la voie de l'acide rétinoïque connue pour stimuler la différenciation des SSCs (Yang *et al.*, 2013).

C-Kit

C-kit est un récepteur membranaire de type tyrosine kinase, très conservé au cours de l'évolution, qui est souvent utilisé comme marqueur de spermatogonies différenciés. En effet, il est exprimé dans les spermatogonies différenciées mais absent dans les spermatogonies indifférenciées chez la souris (Schrans-Stassen *et al.*, 1999). Une diminution de son expression engendre une déplétion des spermatogonies A différenciées tandis que les spermatogonies indifférenciées ne sont pas affectées initialement (Yoshinaga *et al.*, 1991). Cependant, une étude a montré qu'il était également exprimé dans les cellules souches spermatogoniales chez le médaka (Hong *et al.*, 2004). Le ligand de c-kit, SCF1 (*Stem cell factor 1*), est exprimé sous deux formes, membranaire et sécrétée, et joue un rôle important dans le chimiotactisme des PGCs lors de leur migration (Gu *et al.*, 2011; Srihawong *et al.*, 2015). Il est également exprimé

par les cellules de Sertoli et permet la prolifération des spermatogonies c-kit⁺ chez la souris (Tajima *et al.*, 1994) et l'inhibition de l'apoptose des gonocytes *in vitro* (Tu *et al.*, 2007).

Intégrines

Les intégrines font partie de la super-famille des récepteurs d'adhésion cellulaire qui sont capables de se lier à des ligands de la matrice extracellulaire (MEC), à des ligands de surface cellulaire ou encore à des ligands solubles (Takada *et al.*, 2007). Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous unité α et d'une sous unité β . Chez l'humain, 18 sous unité α et 8 sous unités β ont été identifiées pouvant générer 24 intégrines différentes, chaque intégrine ayant ses propres ligands et une distribution tissulaire spécifique (Takada *et al.*, 2007). Au sein de cette super-famille, les intégrines composées des sous unités $\alpha6$ et $\beta1$ sont des marqueurs des cellules souches spermatogoniales chez la souris (Shinohara *et al.*, 1999). Les cellules intégrine $\beta1^+$ sont capables de coloniser l'épithélium séminifère et de générer une lignée germinale jusqu'au stade spermatozoïde (Shinohara *et al.*, 1999). Ces intégrines $\beta1$ permettent également l'adhésion des SSCs à la laminine de la lame basale au sein de la niche germinale (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008b). Les cellules souches spermatogoniales intégrine $\alpha6^+$ sont quant à elles capables de coloniser jusqu'à deux fois plus efficacement l'épithélium séminifère de souris par rapport aux cellules intégrines $\beta1^+$ (Shinohara *et al.*, 1999).

Cadhérines

La cadhérine CDH1 (aussi appelée E-cadhérine) a été identifiée comme marqueur spécifique des spermatogonies indifférenciées chez la souris (Tokuda *et al.*, 2007) et chez le mouton (Zhang *et al.*, 2014). CDH1 est une protéine d'adhésion homophile (qui interagit avec une protéine identique), distribuée sur toute la membrane cellulaire. Elle présente un domaine extracellulaire avec cinq séquences répétées, spécifique des cadhérines, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire très conservé qui se lie au complexe d'adhésion cytoplasmique. Ce dernier comprend notamment la caténine- β et permet la liaison des cadhérines à l'actine du cytosquelette (Wijnhoven *et al.*, 2000). Dans le testicule de souris, les cellules CDH1⁺ seraient les A_s, les A_{pr} et les A_{al4-8} qui exprimeraient également l'intégrine $\alpha6$ ou l'intégrine $\beta1$ (Tokuda *et al.*, 2007). Chez le mouton, CDH1 serait exprimé uniquement

au niveau des A_s et A_{pr} (Zhang *et al.*, 2014). Les cellules CDH1 positives expriment également un autre marqueur de spermatogonie, le PLZF (Zhang *et al.*, 2014).

PLZF

Le facteur de transcription PLZF (*Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger*) fait partie de la famille des protéines à doigt de gant de type *Krüppel-like*. C'est une protéine conservée car elle est exprimée dans les spermatogonies indifférenciées mais également dans les spermatogonies différenciées chez différentes espèces (Costoya *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2009; Ozaki *et al.*, 2011; Bellaïche *et al.*, 2014). Chez la souris, PLZF a été décrit pour son implication dans la régulation de l'autorenouveau et le maintien des cellules souches spermatogoniales. En effet, les souris n'exprimant pas *Plzf* montrent une perte progressive des spermatogonies avec l'âge, associée à une augmentation de l'apoptose et à la perte de la structure tubulaire mais sans défaut de différenciation ou perte des cellules de Sertoli (Costoya *et al.*, 2004).

Id4

L'inhibiteur de la différenciation ID4 (*DNA-binding protein inhibitor 4*) est une protéine de liaison à l'ADN possédant un motif bHLH (*basic helix-loop-helix*). Ce facteur de transcription est fortement exprimé dans les cellules souches et les progéniteurs et son expression décroît dans les cellules différenciées (pour revue, Ling *et al.*, 2014). ID4 a notamment été caractérisé pour son rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales (Yun *et al.*, 2004). Dans le testicule de souris, l'expression d'ID4 est restreinte aux spermatogonies A_s où il stimulerait l'autorenouveau des SSCs (Oatley *et al.*, 2011). La mise en place d'un modèle de souris transgénique (Id4-2A-CreERT2-2A-tdTomato) permettant le suivi des cellules ID4⁺ et l'inactivation d'*Id4* ont permis de valider les potentiels d'autorenouveau et de différenciation de ces cellules (Sun *et al.*, 2015).

Nanos

Les protéines de liaison à l'ARN Nanos sont notamment caractérisées par la présence de deux motifs *zinc-finger* au niveau de leur extrémité C-terminale. Ces motifs de liaison à l'ARN vont permettre la régulation post-transcriptionnelle des ARNm cibles en se liant à leur 3'UTR

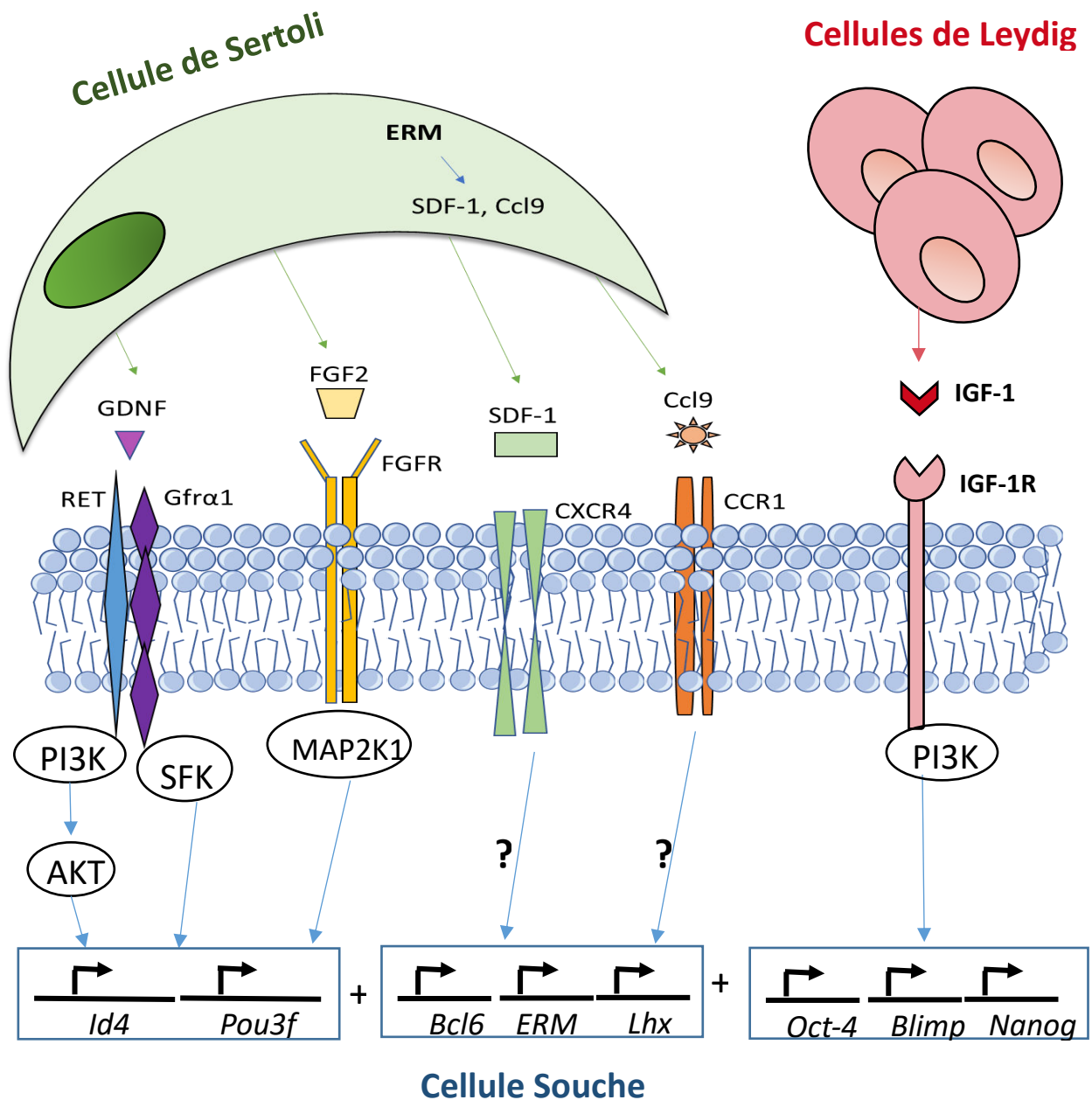


Figure 10 : Schéma représentant les voies régulant l'autorenouement des cellules souches spermatogoniales (SSC) dans les testicules de souris.

Les cellules de Sertoli sont à l'origine de la sécrétion de différents facteurs comme le GDNF, FGF2, SDF-1 ou encore Ccl9 qui vont être capables de se fixer sur des récepteurs membranaires de la SSC. Les cellules de Leydig libèrent quant à elles IGF-1 qui lui aussi va se lier au récepteur membranaire IGF1R des SSC. Cette interaction ligand/récepteur va alors activer des voies de signalisation comme la voie PI3K, ou MAPK qui vont alors réguler des gènes tel que *id4* *Oct-4* ou *ERM*. Adapté de Chen et Liu, 2015 et, Huang et al., 2009.

(Hashimoto *et al.*, 2010). Chez les Vertébrés, trois homologues de la protéine ont été décrits, Nanos1, Nanos2 et Nanos3. Ces protéines sont impliquées dans la survie et la migration des PGCs ainsi que dans le maintien des cellules souches germinales (Lai *et al.*, 2012; Kopranner *et al.*, 2016). Nanos2 a une expression limitée aux SPG A_s et A_{pr} chez la souris, la truite et le mérrou (Sada *et al.*, 2009a; Bellaïche *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017). La sous-expression de Nanos1 chez l'homme engendre un syndrome « Sertoli cell only » où les testicules sont déplétés en cellules germinales (Kusz-Zamelczyk *et al.*, 2013). En revanche, chez la souris une perturbation de l'expression de Nanos1 n'a aucun impact sur la fertilité (Haraguchi *et al.*, 2003) alors que la diminution de l'expression de Nanos2 ou de Nanos3 provoque une infertilité (Tsuda *et al.*, 2003). Enfin, ces protéines peuvent présenter des redondances partielles (Beer and Draper, 2013a).

e. La niche germinale, un environnement très riche pour contrôler le devenir des SSCs

La niche germinale est à l'origine de nombreux signaux paracrines afin de réguler la balance entre auto-renouvellement et différenciation des SSCs. La structure de la niche germinale varie en fonction des espèces. Chez la drosophile, la niche des cellules souches germinales comprend 2 types de cellules somatiques : les cellules du hub et les cellules souches somatiques (pour revue, Li and Xie, 2005). Les cellules du hub vont interagir avec les cellules souches germinales (GSCs) en exprimant des cytokines comme BMP ou Upd (*Unpaired*) qui contrôlent l'auto-renouvellement des GSCs via la voie JAK/STAT (Kiger *et al.*, 2001; Kawase *et al.*, 2004). Les cellules souches somatiques vont quant à elles réguler la différenciation des GCs. Lorsque les cellules souches somatiques sont mutées pour Egfr et raf, le nombre de GSCs augmente fortement et une diminution de leur capacité à revenir à l'état quiescent est observée, elles restent donc actives plus longtemps par rapport à celles des individus sauvages (DiNardo *et al.*, 2000). Chez les Mammifères, la niche germinale se compose des cellules de Sertoli, des cellules péritubulaires et des composants de l'espace interstitiel comme les cellules de Leydig, les macrophages et les vaisseaux sanguins (pour revue, Kostereva et Hofmann, 2008; DeFalco et al. 2015; Potter and DeFalco, 2017). Les interactions entre la niche germinale et les SSCs se produisent à la fois par contact cellulaire mais également via des cytokines (Figure 10). La lame basale permet l'ancrage des SSCs au sein de la niche et les facteurs de croissance (CSF-1, IGF1, VEGF) issus du compartiment interstitiel participent à la

spécificité de localisation de la niche au niveau du compartiment basal de l'épithélium séminifère faisant face à l'interstitiel (pour revue, Potter and DeFalco, 2017). Cette composante de la niche a été initialement mise en évidence chez la souris par la distribution non aléatoire des spermatogonies indifférenciées (Chiarini-Garcia *et al.*, 2003). Puis l'apport de modèles de souris transgéniques Ngn3/GFP (Yoshida *et al.*, 2017) associé à l'observation microscopique de la surface des tubes séminifères et à leur modélisation, a permis de mettre en évidence une localisation préférentielle des spermatogonies indifférenciées au regard des vaisseaux sanguins. De plus, les macrophages présents dans le tissu interstitiel et au sein de la couche myoïde périvitulaire sont particulièrement présents à proximité des spermatogonies indifférenciées. La déplétion temporaire de ces derniers engendre une perte massive des spermatogonies différenciées, suggérant un rôle inattendu des macrophages dans la régulation de la différenciation des spermatogonies (DeFalco *et al.*, 2015).

Les cellules de Sertoli sont majoritairement impliquées dans la production de facteurs de croissance pour l'autorenouveau cellulaire et favorisent le maintien des SSCs en culture (Pramod and Mitra, 2014). Parmi les facteurs de croissance sécrétés par les cellules de Sertoli, le GDNF, dont l'expression est régulée par FSH (Ding *et al.*, 2011), a un rôle essentiel puisqu'une diminution de son expression entraîne une diminution du nombre de cellules germinales (Meng *et al.*, 2000). En revanche, une surexpression du GDNF induit une hyperprolifération et le développement de tumeurs séminales (Meng *et al.*, 2001), suggérant que le taux de GDNF détermine le destin cellulaire des SSCs. Par ailleurs, le FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) stimule l'autorenouveau des SSCs. Son rôle a notamment été mis en évidence par des approches *in vitro*. Chez l'homme, le traitement de cultures de SSCs avec du FGF2 et du LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) permet d'augmenter le nombre et le diamètre des colonies de SSCs (Mirzapour *et al.*, 2012). Chez la souris, le traitement des cultures avec du FGF2 et du GDNF permet la survie à long terme et l'expansion des SSCs (Kubota *et al.*, 2004). FGF2 stimule, via la voie des MAPK, l'expression de gènes tels que ERM, Bcl6b et Lhx1 responsables de l'autorenouveau des SSCs (Ishii *et al.*, 2012). Enfin, il a aussi été montré que FGF2 était capable de réguler la prolifération et l'activité des SSCs par phosphorylation autocrine de la voie AKT et de la voie ERK1/2 *in vitro* (Zhang *et al.*, 2012b). Les cellules de Sertoli sécrètent aussi des chimiokines assurant le « homing » des SSCs dans la niche comme SDF-1 dont le récepteur CXCR4 est exprimé par les SSCs (Chen and Liu, 2014). L'inhibition de

CXCR4 par un antagoniste ou une diminution de SDF-1 provoque une perte de la lignée germinale en culture (Yang *et al.*, 2013). Une approche transcriptomique par *microarray* a également montré qu'une perturbation de la voie CXCR4/SDF-1 engendre une diminution du nombre de transcrits FGF2 (Yang *et al.*, 2013), suggérant qu'un réseau de régulation entre SDF-1, FGF2 et GDNF influencerait l'autorenouveaulement des SSCs. Le couple ligand récepteur CCL9/CCR1 est lui aussi impliqué dans la régulation des SSCs au sein de la niche germinale (Simon *et al.*, 2010). *Ccl9* est un gène exprimé par les cellules de Sertoli qui code pour la chimiokine CCL9 sécrétée dans le milieu extra-cellulaire et qui agit de façon paracrine sur les SSCs qui expriment le récepteur CCR1. Enfin, ERM (*Ets-related molecule* ; aussi nommé ETV5) est un des rares facteurs de transcription exprimé spécifiquement par les cellules de Sertoli qui soit capable de contrôler l'autorenouveaulement des SSCs. Chez la souris ayant une invalidation homozygote du gène *Erm* (*Erm*^{-/-}), il est observé une perte de l'autorenouveaulement des SSCs, ce qui engendre à long terme une perte des cellules germinales et un syndrome *Sertoli cell only* (Chen *et al.*, 2005). Les souris *Erm*^{-/-} présentent également une diminution de l'expression de gènes de chimiokines comme *Sdf1*, *Cxcl5* et *Ccl7*, appuyant l'hypothèse que ces gènes jouent un rôle dans la régulation de la niche des SSCs. Enfin, ERM a également été décrit comme régulateur de la voie CXCR4 (Wu *et al.* 2011). Les cellules de Leydig sont aussi impliquées dans la régulation des SSCs au sein de la niche germinale. Elles expriment le facteur CSF1 (Colony Stimulating Factor 1) connu pour contrôler l'autorenouveaulement des SSCs (Oatley *et al.*, 2009). Le récepteur de CSF1 (CSF1R) est fortement exprimé dans les SSCs et les spermatogonies indifférenciées (Oatley *et al.*, 2009). En se liant à son récepteur, CSF1 permet de stimuler la prolifération et l'autorenouveaulement des cultures de spermatogonies *ex vivo* (Kokkinaki *et al.*, 2009; Oatley *et al.*, 2009) . Cependant le rôle de CSF1/CSF1R *in vivo* reste encore à caractériser. Au sein du testicule, les cellules de Leydig présentent également une source d'IGF1 (*Insulin like Growth Factor 1*) qu'elles sont capables de libérer en culture pour leur propre différenciation, prolifération et production de testostérone. L'IGF-1 sécrété par les cellules de Leydig est également un facteur clé dans le maintien de la pluripotence de SSCs *in vitro*. En effet, le blocage de la phosphorylation du récepteur IGF-1 et de la voie de signalisation associée (PI3K) réduit de façon drastique l'activité phosphatase alcaline des cellules en culture ainsi que l'expression de gènes de pluripotence tel que Oct-4, Blimp1 ou encore Nanog (Huang *et al.*, 2009).

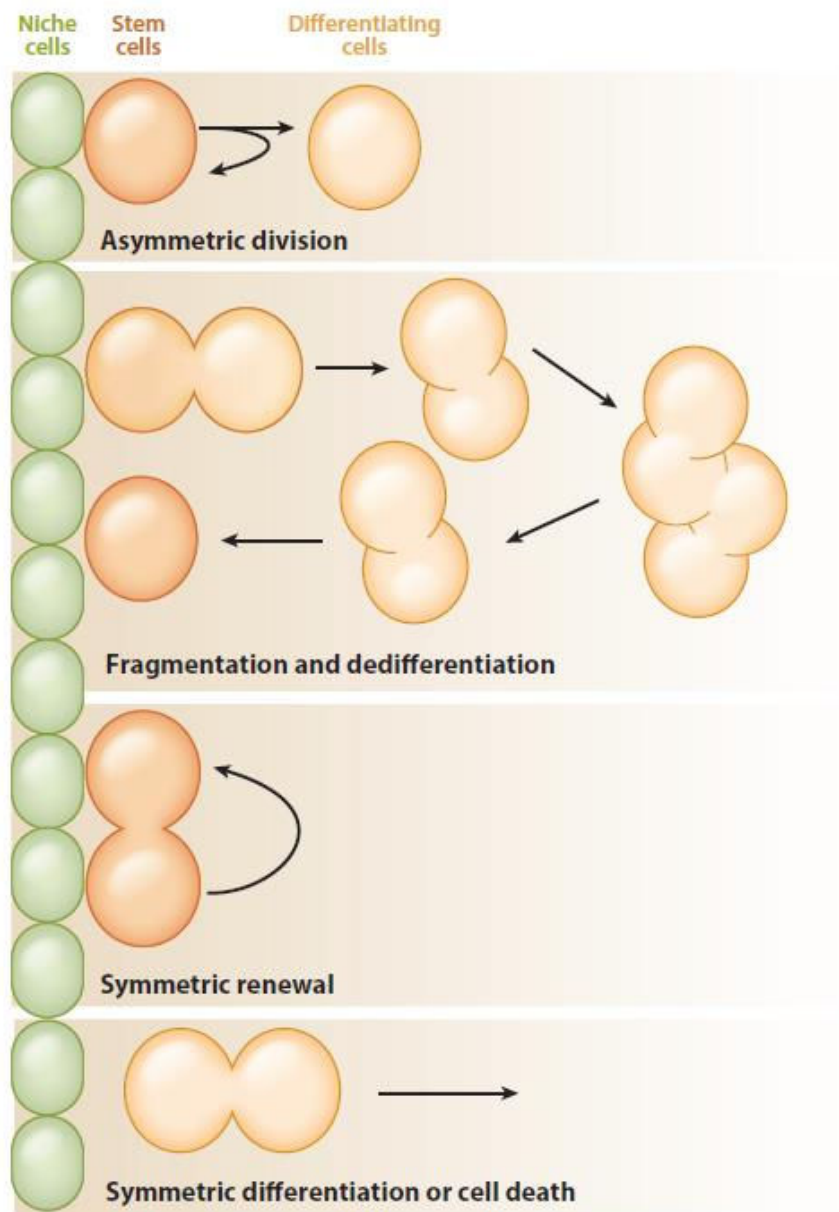


Figure 11 : Les SSCs s'autorenouvèlent selon divers modes.

Les SSCs peuvent s'auto-renouveler par différents mécanismes. Par division asymétrique, une cellule fille reste souche tandis que l'autre éloignée de la niche, se différencie. Par fragmentation des ponts cytoplasmiques réunissant des spermatogonies, celles-ci peuvent se dédifférencier et retourner à la niche. Par division symétrique, les deux cellules filles peuvent rester souche ou au contraire quitter la niche et se différencier (Greenspan *et al.*, 2015).

f. La dynamique du compartiment souche

Malgré des descriptions morphologiques chez de nombreuses espèces, l'identification de cellules souches spermatogoniales fait encore l'objet de débats scientifiques. Il a récemment été proposé un modèle chez la souris où les spermatogonies A_{pr} et les A_{al} ont la possibilité de revenir à un état souche sous certaines conditions (Nakagawa *et al.*, 2010) (Figure 11). La comparaison d'expression génique des spermatogonies indifférenciées chez la souris a montré que certains gènes comme PLZF ou CDH1 présentaient des profils d'expression similaires chez les spermatogonies A_s , A_{pr} et A_{al} . En revanche, d'autres gènes comme la NGN3 et GFR α 1 sont exprimés respectivement de façon minoritaire et majoritaire dans des sous populations de spermatogonies A_s , A_{pr} et A_{al} . De ce fait, on observe des hétérogénéités dans l'expression de ces deux gènes même au sein d'un groupement spermatogénique (A_{pr} ou A_{al}). De plus, des analyses par *pulse-chase* qui permettent le suivi de molécules d'intérêts ont révélé que les A_s NGN3⁺ avaient tendance à quitter le compartiment des A_s pour devenir des A_{pr} et que peu d'entre elles étaient capables d'auto-renouveaulement. Cependant, il a également été observé que des spermatogonies A_s GFP⁺ étaient également Gfr α 1⁺ suggérant qu'une petite population cellulaire a subi une réversion des cellules NGN3⁺ en Gfr α 1⁺ pouvant être issues de spermatogonies A_s , A_{pr} ou A_{al} . De plus, la fréquence de cette réversion augmente de façon drastique lors de dommages tissulaires impliquant la mise en place d'une régénération. Ces mécanismes suggèrent donc que ces cellules plus engagées dans la spermatogenèse (NGN3⁺) pourraient agir comme des cellules souches potentielles, et qu'elles ont donc gardé leur capacité d'auto-renouveaulement en latence.

Par la suite, des expériences par vidéomicroscopie ont révélé la présence d'un mécanisme cellulaire appelé la fragmentation permettant aux spermatogonies interconnectées par des ponts cytoplasmiques de générer différents clusters cellulaires regroupant une ou plusieurs spermatogonie(s). Ce mécanisme, de fragmentation, également décrit chez la drosophile ne (Sheng and Matunis, 2011), révèle la production de spermatogonies isolées par rupture de ponts intercellulaires au sein du syncytium. Chez la drosophile, ce mécanisme s'accompagne du retour de la spermatogonie au contact du hub. Ce constat met en évidence une dédifférenciation et un retour à l'état souche des cellules. Chez la souris, la fragmentation de A_{al16} a permis de générer deux groupes de deux spermatogonies qui par la suite sont capables de générer des spermatogonies A_{al4} , alors que le groupe des 12 spermatogonies A_{al} restantes

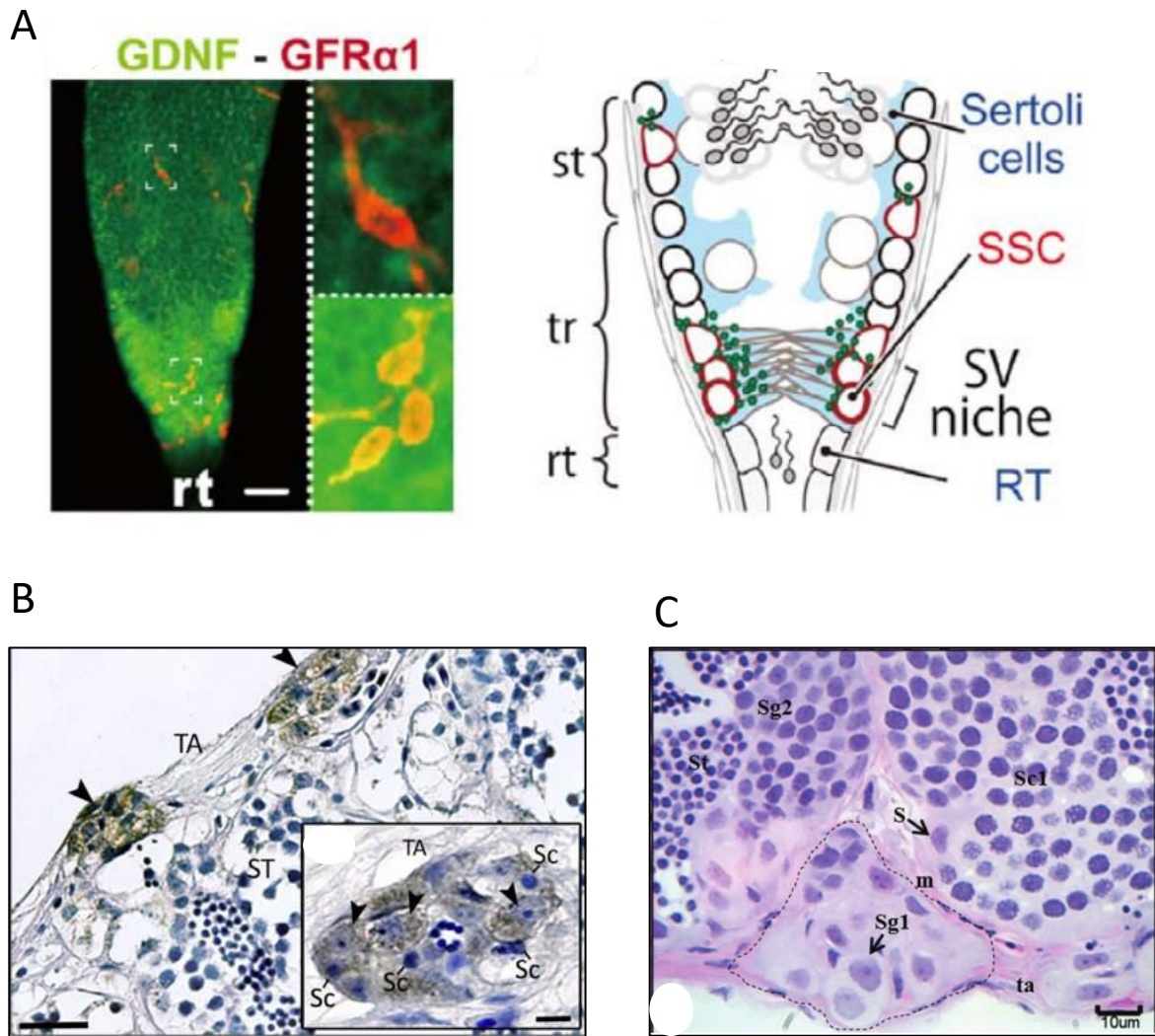


Figure 12 : Présence de nouvelle niche plus en périphérie chez un Mammifère et des Ostéichthyens.

A. Photo d'un immunomarquage GDNF et GFR α 1 sur un testicule de hamster. Mise en évidence d'une niche périphérique à proximité du rete testis (rt) (gauche). Schéma représentant l'organisation testiculaire au niveau de la niche (droite). SSC : cellules souches spermatogoniales ; RT : rete testis ; SV niche : sertoli valve niche. **B.** Immunohistochimie GFR α 1 dans le testicule d'un tilapia du Nil montrant l'isolement de groupe de spermatogonies (marquées en marron). TA : tunique albuginée ; Sc : cellules de Sertoli. **C.** Coupe histologique de testicule chez le Cichlidé *Cichla kelberi* mettant en évidence un cluster de spermatogonies primaires (Sg1). Sg2 : spermatogonie secondaire ; ta : tunique albuginée ; S : cellules de sertoli ; Sc1 : spermatocyte primaire ; St : spermatide. Figure d'après Aiyama *et al.*, 2015, Santos Nassif Lacerda *et al.*, 2013 et Siqueira-Silva *et al.*, 2013.

rentre en apoptose de façon synchrone (Nakagawa *et al.*, 2010). Même si les mécanismes engendrant la fragmentation du syncytium ne sont pas identifiés, l'hypothèse que les cellules détachées permettraient d'augmenter le nombre de cellules souches par dédifférenciation est soutenue par le fait que lorsque la spermatogenèse est endommagée, par exemple après irradiation, des clones de 3, 5 ou 11 A_{al} sont communément observés (pour revue, De Rooij, 2001).

Il a été récemment identifié chez les Vertébrés osseux, de nouvelles niches germinales périphériques en supplément de celles contenant les cellules souches réparties dans les tubules/lobules précédemment décrites (Figure 12). Chez le hamster, des segments terminaux des tubes séminifères de type valve-like situés à proximité du *rete testis* ont été décrits comme étant une niche pour les spermatogonies GFR α 1 positives (Aiyama *et al.*, 2015). L'épithélium de ces valves sertoliennes est composé de cellules de Sertoli modifiées qui ont gardé leur capacité de prolifération et qui sont capables de sécréter du GDNF afin de supporter la prolifération et la survie d'une sous population de spermatogonies A_s. De plus, seules des spermatogonies exprimant GFR α 1 sont présentes, aucune cellule en spermatogenèse avancée n'a été observée, ce qui laisse penser à une niche de réserve de SSCs. Chez le tilapia du Nil, des coupes transversales de testicule ont montré que les spermatogonies GFR α 1⁺ enveloppées de cellules de Sertoli, étaient regroupées en amas et isolées du reste du testicule dans la région distale des tubules séminifères, accolées à l'albuginée et que chaque spermatogonie était enveloppée d'une cellule de Sertoli (Santos Nassif Lacerda *et al.*, 2013). Des amas de spermatogonies isolées des lobules et à proximité immédiate de l'albuginée ont aussi été décrits chez le Cichlidé *Cichla kelberi* (Siqueira-Silva *et al.*, 2013). Cette structuration isole donc ces SSCs, dont la fonction reste à explorer, des autres cellules germinales.

g. Les SSCs, des cellules utiles pour la préservation d'espèces

La transplantation des SSCs a tout d'abord été développée pour valider par un test fonctionnel *in vivo* le potentiel souche de cellules, préalablement isolées et caractérisées *in vivo* ou *in vitro* par l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques. Cette technique a été initialement employée chez le poulet pour les PGCs (Tajima *et al.*, 1993) puis chez la souris pour les SSCs (Brinster and Zimmermann, 1994) et plus récemment elle a été étendue aux poissons tels que

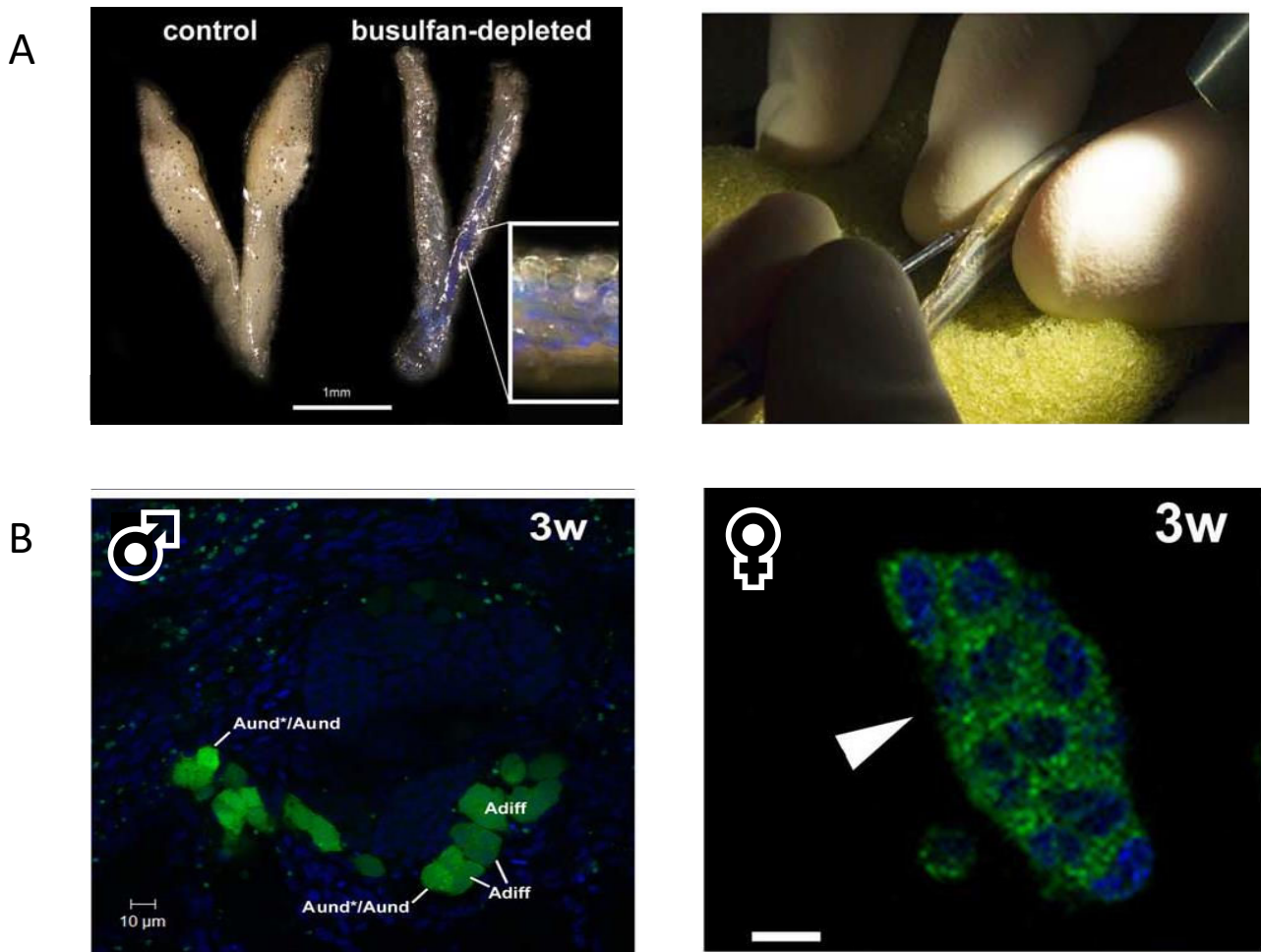


Figure 13 : La transplantation de SSCs chez le poisson-zèbre.

A : Les gonades du poisson receveur sont préalablement déplétées en cellules germinales par traitement au busulfan et augmentation de la température de l'eau (contrôle à gauche, individu traité à droite). Les SSCs sont injectées avec du bleu Trypan, colorant qui permet de suivre l'injection. La transplantation des SSCs est effectuée par le pore génital. **B :** Après transplantation, les SSCs marquées GFP transplantées chez des mâles ont colonisé la gonade et ont généré des spermatogonies différenciées à 3 semaines post-transplantation. Après transplantation de SSCs dans un individu femelle, les cellules marquées GFP se sont différenciées en ovocytes. Les SSCs présentent donc une plasticité en fonction du sexe du receveur. Figure issue de Nobrega *et al.*, 2010.

le poisson-zèbre ou le tilapia du Nil (Lacerda *et al.*, 2010; Nobréga *et al.*, 2010). La transplantation consiste à injecter des cellules souches potentielles, marquées (GFP, Lac-Z, PKH26, ...) dans un individu receveur dont les gonades ont été déplétées de leur lignée germinale par traitement chimique (Busulfan) ou par mutation. Cette étape de déplétion germinale peut être omise dans le cas de transplantations dans des embryons alors que les gonades se mettent tout juste en place. (Yoshizaki *et al.*, 2011). De plus, la transplantation de cellules chez l'embryon à des stades suffisamment précoces où le système immunitaire n'est pas encore complètement fonctionnel permet d'exclure tout rejet de la greffe cellulaire (Yoshizaki *et al.*, 2012). Si les cellules transplantées présentent un potentiel souche, elles vont alors être capables de coloniser la gonade hôte, de proliférer et de se différencier afin de générer une lignée germinale complète. A noter, chez certaines espèces de poissons, qu'il a été démontré que les SSCs présentent une plasticité cellulaire *in vivo* (Okutsu *et al.*, 2006a) (Figure 13), plasticité également retrouvée *in vitro* chez la souris (Wang *et al.*, 2012a). En effet, chez le poisson-zèbre par exemple, des SSCs GFP⁺ ont été transplantées dans des individus receveurs mâles déplétés de leur lignée germinale par traitement au busulfan, et dans des individus receveurs femelles adultes. Deux semaines post-transplantation, les SSCs avaient colonisé l'épithélium séminifère mâle et 3 semaines post-transplantation, des cystes contenant des cellules GFP⁺ à différents stades de spermatogenèse étaient observables (Nobréga *et al.*, 2010). De plus, chez les femelles à trois semaines post-transplantation, des cellules GFP⁺ étaient observables dans l'ovaire et à un mois post transplantation, ces cellules avaient généré des ovocytes à des stades avancés (Nobréga *et al.*, 2010). Des SSCs issues d'un individu mâle sont donc capables de coloniser et de générer des gamètes à la fois mâles et femelles en fonction de l'environnement dans lequel elles évoluent. De plus, d'autres études ont également montré la capacité de ces cellules à coloniser la gonade d'espèces phylogénétiquement proches de l'individu donneur. Ainsi, chez les salmonidés, lors de la xénogreffe de SSCs de truite marquées GFP dans des saumons receveurs, les SSCs sont capables de coloniser la gonade mâle et femelle des receveurs et de générer une descendance F1 viable avec des gamètes marquées GFP (Okutsu *et al.*, 2007). D'autres xénogreffes ont également été réalisées chez d'autres espèces de poissons (Yazawa *et al.*, 2010; Morita *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016) mais également chez les félins (Silva *et al.*, 2012) et se sont révélées effectives. En conclusion, en plus de valider le potentiel souche de ces cellules, la

transplantation ouvre la voie à la préservation d'espèces en danger d'extinction par xénotransplantation de SSCs.

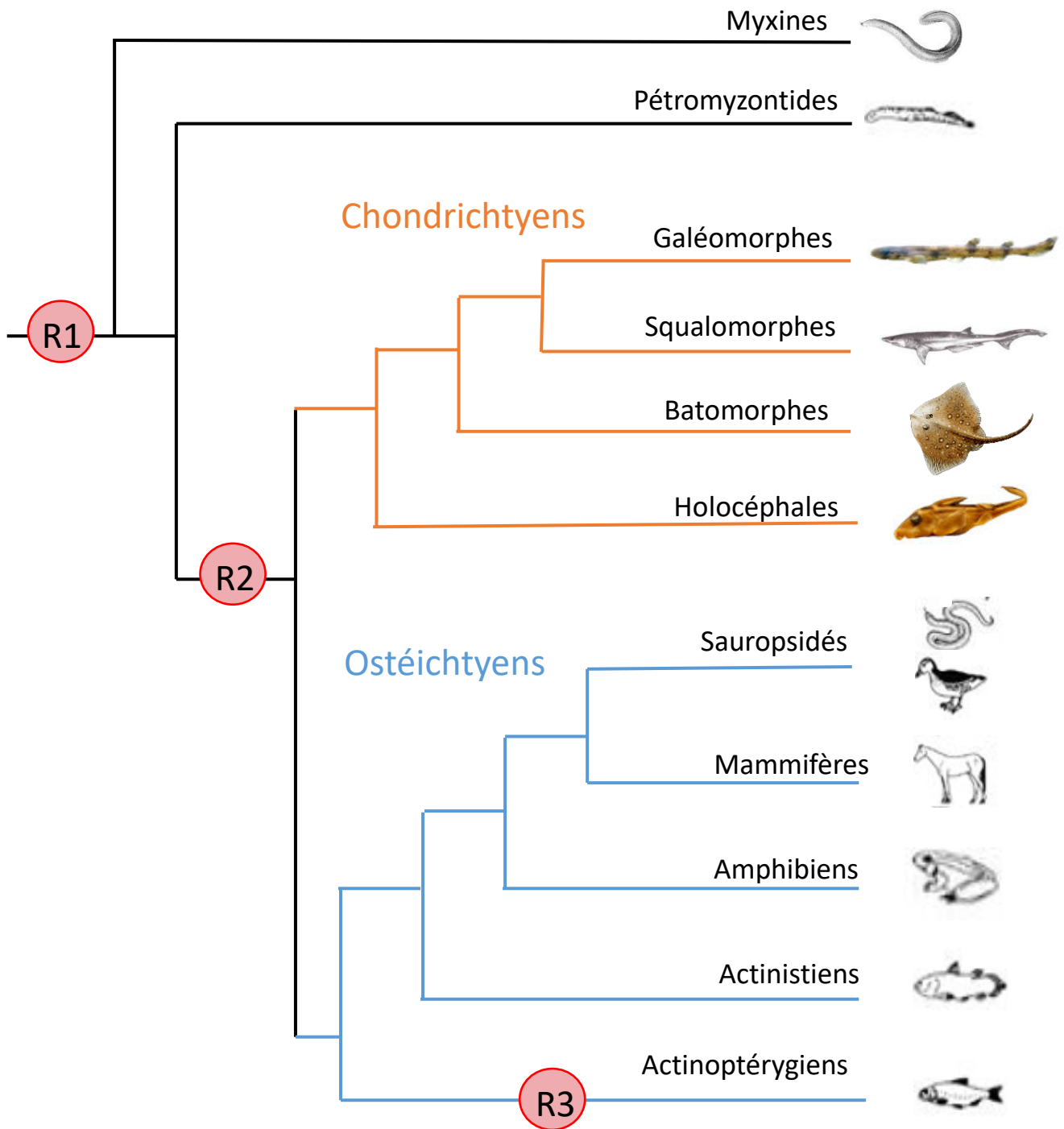


Figure 14 : Arbre phylogénétique simplifié des Vertébrés.

Les Chondrichthyens ou poissons cartilagineux sont représentés en orange et leur groupe frère, les Ostéichthyens, Vertébrés à squelette osseux, en bleu. Le groupe des Myxines et des Pétromyzontides (en noir) n'ont pas subi la deuxième duplication du génome, observée chez les Chondrichthyens et les Ostéichthyens. R1, R2, R3 représentent trois duplications de génome qui se sont produites au cours de l'évolution.

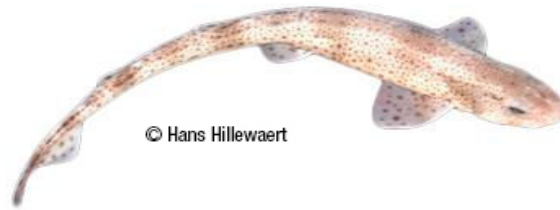
3. Le modèle *Scyliorhinus canicula*

a. Appartenance au groupe peu étudié des Chondrichthyens

Le sous-embranchement des Vertébrés se subdivise en Agnathes, désignant l'ensemble des Crâniates dépourvus de mâchoire (myxines, lamproies) et en Gnathostomes, espèces pourvues d'une mâchoire cartilagineuse dérivant du premier arc branchial. Au sein des Gnathostomes, deux classes sont présentes, les Chondrichthyens, poissons cartilagineux (raies, requins et chimères) et les Ostéichthyens, Vertébrés osseux (Figure 14). Au sein des Chondrichthyens, deux groupes auraient divergé il y a 370-380 millions d'années (MA) les Holocéphales (chimères) et les Elasmobranches (requins et raies) (Janvier and Pradel, 2016), la divergence entre les Chondrichthyens et les Osteichthyens étant estimée à 462-421 MA. La classe des Chondrichthyens se compose d'au moins 900 espèces différentes avec 55% de raies, 42% de requins et 3% de chimères recensés entre les années 1990 et 2001. Récemment, grâce à d'autres études et une méta-analyse génétique, de nouvelles espèces ont également été identifiées amenant à 1271 le nombre d'espèces de Chondrichthyens répertoriés sur Fishbase (www.fishbase.org). La petite roussette *Scyliorhinus canicula* (Figure 15) appartient aux Galéomorphes, requins ayant une nageoire anale, et à l'ordre des Carcharhiniformes comprenant entre autre la famille des Scyliorhinidae, la plus importante famille de requins en nombre, regroupant à nos jours au moins 170 espèces distinctes. Contrairement à d'autres classes comme celle des Ostéichthyens, les Chondrichthyens restent peu étudiés. Les Ostéichthyens, qui regroupent des clades tels que les tétrapodes et les poissons téléostéens, font l'objet d'un grand nombre d'études, du fait de la présence d'organismes modèles dans ces taxons (souris, xénope, poisson-zèbre).

Néanmoins, les Chondrichthyens se situent à une position phylogénique clé à la base des Vertébrés et sont de ce fait très intéressants pour les études évolutives. Ils regroupent les espèces de Vertébrés les plus anciennes possédant un pancréas distinct composé des mêmes types cellulaires que ceux identifiés chez les Mammifères (cellules α , β , δ et les cellules PP) (Youson and Al-Mahrouki, 1999). Ce sont également les espèces de Vertébrés les plus ancestrales ayant un système immunitaire adaptatif comprenant des immunoglobulines (Immunoglobulines spécifiques IgNAR), des récepteurs aux cellules T (TCR), et un complexe

A



B

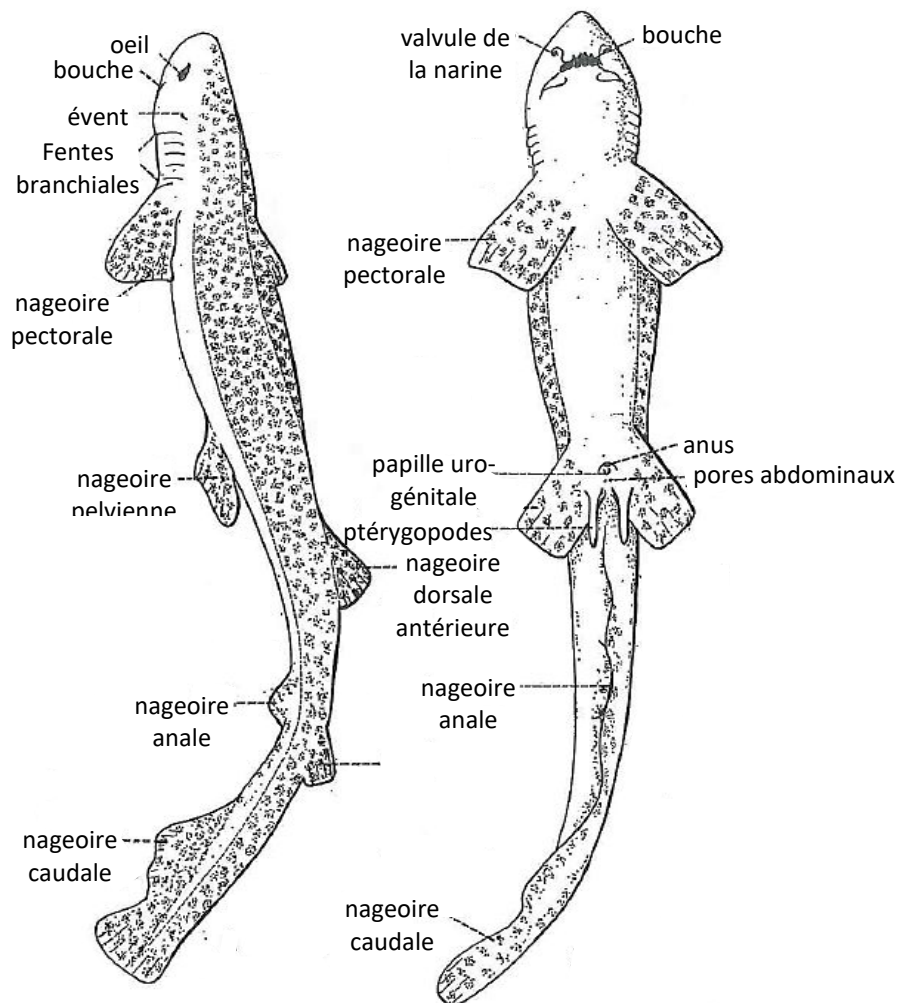


Figure 15 : La petite roussette *Scyliorhinus canicula*.

A : Photographie de petite roussette *Scyliorhinus canicula*. **B** : Anatomie externe de la petite roussette. A gauche vue latérale, à droite vue ventrale. Adapté à partir de Tixier et Gaillard, 1957.

majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II (pour revue, Flajnik et Rumpf, 2000) .

b. Une espèce de nos côtes, non vulnérable

La petite roussette *Scyliorhinus canicula*, est une espèce abondante sur les côtes normandes (environ 5 000 tonnes de petites roussettes pêchées par an (Séret, 2010) pour environ 15 000 tonnes de requins pêché en France chaque année) et fait partie des requins les plus communément trouvés sur les côtes Européennes (Ellis and Shackley, 1997). Malgré une pêche relativement importante, elle reste une espèce non vulnérable qui est classée dans la catégorie préoccupation mineure (LC) par l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN). Elle présente une large distribution au niveau de la côte atlantique Nord-Est, du sud de la Norvège jusqu'au Nord du Sénégal, et est aussi retrouvée sur l'ensemble des côtes méditerranéennes (<http://www.fishbase.org>). *S. canicula* est une espèce démersale qui peut vivre à des profondeurs comprises entre 10m et 780m mais est préférentiellement présente entre 300m et 500m de fond en mer méditerranée (mer ionienne, (Mytilineou *et al.*, 2005)) et à une profondeur comprise entre 10 et 110m en atlantique Nord-Est (mer du nord, (George, 2009)). Elle se nourrit principalement d'invertébrés benthiques tels que les mollusques, les crustacés, les petits céphalopodes ou encore les vers polychètes, mais aussi de petits poissons osseux (Compagno, 1984). Sa taille adulte peut varier en fonction de sa localisation géographique, les roussettes de méditerranée étant plus petites (mer Egée (37-48 cm) (Kousteni *et al.*, 2010)) que celles trouvées dans la Manche (50-70 cm) (Ivory *et al.*, 2004). Leur espérance de vie est de 10 à 12 ans avec une maturité sexuelle à 6,6 ans pour les mâles et 7,9 ans pour les femelles (Ivory *et al.*, 2004). Elle a un sexe ratio légèrement en faveur des femelles (Ivory *et al.*, 2004) et semble s'accoupler en eau profonde au cours de l'été (Compagno, 1984). Chez les élasmobranches, environ 43% des espèces sont ovipares (Compagno, 1990), c'est le cas de la petite roussette qui, comme beaucoup de *Scyliorhinidae*, a une fécondation interne au niveau des glandes nidamentaires. Lors de l'accouplement, le mâle va inséminer la femelle grâce à l'un de ses deux ptérygopodes qui sont des organes copulateurs issus de la différenciation des nageoires pelviennes. Une fois que l'accouplement s'est produit, le sperme va être soit directement utilisé pour la fécondation des œufs qui seront pondus au stade blastula minimum 5 jours post-fécondation (Ballard *et al.*, 1993), soit

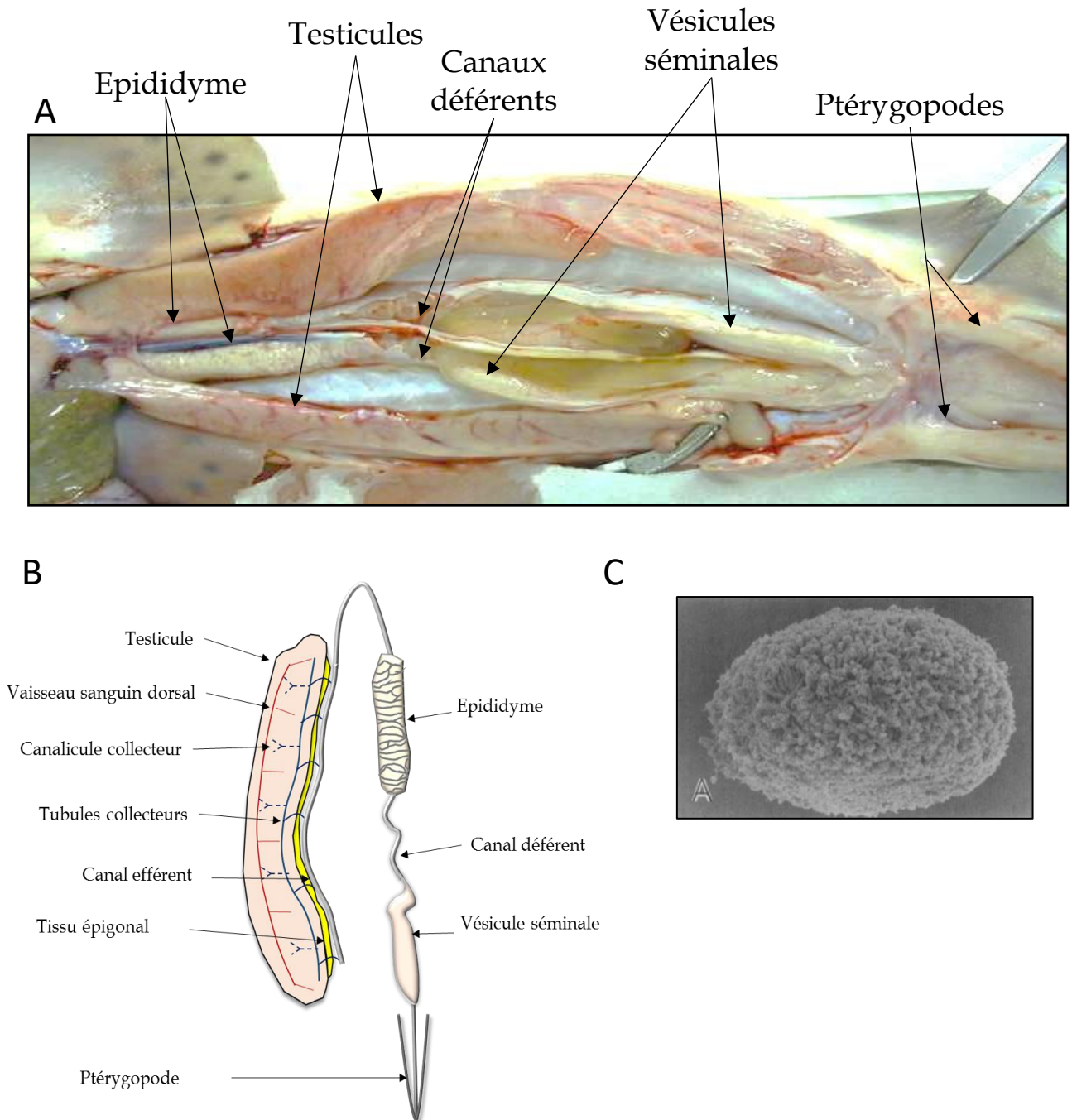


Figure 16 : Photo et schéma du tractus génital mâle chez la petite roussette.

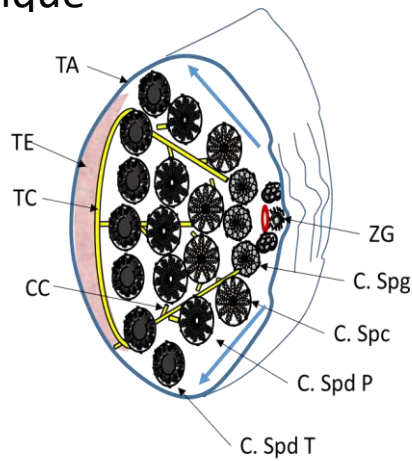
A. Photographie du tractus génital mâle comprenant les testicules, épидидymes, canaux déférents, vésicules séminales et ptérygopodes. **B.** Schéma détaillé du tractus génital mâle chez la petite roussette. **C.** Photographie d'un spermatozeugmata de requin bleu (*Prionace glauca*) constitué de plusieurs couches concentriques de spermatozoïdes.

stocké dans une spermathèque afin d'augmenter le brassage génétique d'où un indice de paternité multiple élevé chez cette espèce (85-92%) (Fitzpatrick *et al.*, 2013).

c. Une organisation testiculaire cystique et polarisée

Chez la petite roussette *Scyliorhinus canicula*, les testicules se situent dans la région médiane de l'individu au niveau dorsal (Figure 16). Ils sont pairs et blanchâtres et se développent de façon inégale selon les individus. Chaque testicule est entièrement enveloppé par l'albuginée. Au niveau de l'extrémité ventrale, une masse de tissu blanchâtre compose le tissu épigonal, tissu lymphomyéloïde spécifique des poissons cartilagineux qui est impliqué dans la production des cellules du système immunitaire. Les testicules sont accolés au niveau antérieur sur la ligne médiane où un mésentère les maintient dorsalement. Il existe 3 types d'organisation testiculaire chez les élastranchés : les testicules « diamétriques », les testicules « radiaux », et les testicules « composés » (Figure 17) (Pratt, 1988a). Dans les testicules diamétriques, le développement cystique se produit dans la largeur du testicule, alors que dans le testicule radial, le développement cystique se produit dans différents lobes du testicule, de la zone centrale germinale du lobe jusqu'à la zone périphérique de celui-ci. Le testicule composé est constitué de cystes qui se développent à la fois dans une direction radiale et diamétrique (Pratt, 1988a). Le testicule de la petite roussette a une organisation diamétrique qui est donc polarisée et organisée en cystes. De par sa polarisation, le testicule peut être subdivisé en 5 zones bien distinctes correspondant aux différents stades de la spermatogenèse (Figure 18) (Loir and Sourdain, 1994; Loir *et al.*, 1995). Au pôle dorsal, la zone A0 est facilement discernable du fait qu'elle est située au-dessus du vaisseau sanguin qui longe le testicule. Elle correspond à la zone de la niche germinale contenant des cellules souches spermatogoniales potentielles (pSSCs) A_s mais aussi des spermatogonies A_{pr} , A_{al} , entourées de cellules de Sertoli dans un tissu dense de cellules somatiques de plus petite taille et plutôt fusiformes. L'identité de ces cellules somatiques reste néanmoins à explorer. Les pSSCs ont été caractérisées chez la petite roussette : elles sont localisées dans la zone germinative, isolées (A_s) et non connectées entre elles par des ponts intercellulaires (Loppion *et al.*, 2008). Au niveau morphologique, elles présentent un gros noyau rond ($10.23 \pm 0.28 \mu\text{m}$ de diamètre) avec une euchromatine abondante et un cytoplasme peu développé contenant

Testicule diamétrique

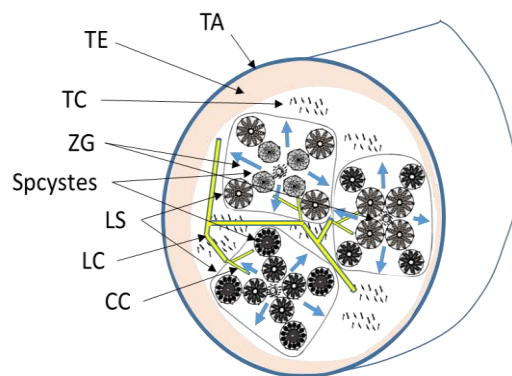


Exemple

Ordre :
Carcharhiniformes



Testicule radial

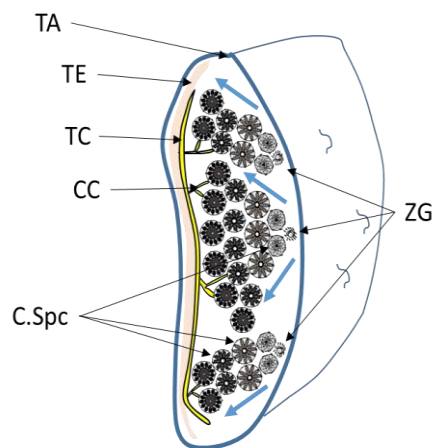


Exemple

Ordre :
Lamniformes



Testicule composé



Exemple

Ordre :
Rajiformes



Figure 17 : Les différentes organisations testiculaires chez les élamobranques.

A. Testicule de type diamétrique présent chez des espèces comme *S. canicula*, le développement cystique se produit dans la largeur du testicule. B. Testicule de type radial présent chez *I. oxyrinchus*. Le développement cystique se produit dans différents lobes du testicule, de la zone centrale germinale du lobe jusqu'à la zone périphérique C. Testicule de type composé présent chez des raies comme *R. clavata*. Les cystes qui se développent à la fois dans une direction radiale et diamétrique. TA : albuginée, TE : tissu épigonal, TC : tube collecteur, CC : canal collecteur, ZG : zone germinale, C. Spg : cystes à spermatogonies, C. Spc : cystes à spermatocytes. Adapté d'après Pratt et al., 1988

très peu d'organites à l'exception d'un grand nombre de mitochondries (Loppion *et al.*, 2008) (Figure 19). Un nuage germinal périnucléaire et associé aux mitochondries a également été observé dans le cytoplasme des pSSCs (Loppion *et al.*, 2008) comme décrit dans les spermatogonies A chez d'autres espèces (Fishelson *et al.*, 2006). L'analyse d'incorporation de BrdU *in vivo* a également montré qu'une partie des spermatogonies de la niche avaient une très faible activité de prolifération (Loppion *et al.*, 2008). Des analyses par hybridation *in situ*, ont montré que les pSSCs exprimaient des marqueurs spécifiques tels que *gfra1* et *pou2* (Bosseboeuf *et al.*, 2014a). Au sein de la niche, des transcrits de *pou2* ont été détectés dans une seule spermatogonie d'un doublet A_{pr}, suggérant une division asymétrique des pSSCs (Bosseboeuf *et al.*, 2014a). Des cultures primaires ont été établies à partir de zones A0 dissociées et enrichies en cellules germinales par *differential plating*. Ces cellules présentent une activité phosphatase alcaline et forment des colonies, deux caractéristiques des cellules souches. De plus, l'ajout de GDNF recombinant humain (10ng/ml) a permis de diminuer l'apoptose, d'augmenter la taille des colonies et de maintenir à long terme (trois mois) ces cultures (Gautier *et al.*, 2014) (Figure 19). Ces résultats suggèrent une conservation des effets pro-survie et prolifératifs de la voie de signalisation GFR α 1 dans les SSCs chez les Chondrichtyens comme cela a été décrit chez les Ostéichtyens, à la fois chez les Mammifères et les Téléostéens (Naughton *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2012; Santos Nassif Lacerda *et al.*, 2013). En revanche, le GDNF n'a pas été identifié chez la petite roussette, ni dans les transcriptomes, ni dans son génome. L'hypothèse de sa substitution par un autre ligand de cette famille, l'artémine, a été émise sur la base de substitutions d'acides aminés clés pour sa liaison au récepteur GFR α 1 de petite roussette (Gautier *et al.*, 2014). Les autres zones testiculaires (A-, B, C et D) sont organisées en cystes qui se composent de cellules germinales associées à des cellules de Sertoli, l'ensemble entouré par des cellules péricystiques (Loir *et al.*, 1995). Dans la zone A-, qui correspond à la zone de prolifération mitotique des spermatogonies et des cellules de Sertoli, il a été décrit la mise en place des cystes par le regroupement progressif des deux types cellulaires avec un positionnement alternatif des cellules de Sertoli (noyau en forme de trapèze) et des spermatogonies autour d'une ébauche de lumière (stades IIa et IIb). A ce stade, des ponts cytoplasmiques sont observés entre les spermatogonies (Loppion *et al.*, 2008). Ces amas cellulaires, qui composeront les futurs cystes, se situent à proximité de la zone germinative. Dans une zone plus distale se trouvent les phases plus tardives de la zone A- (IIc à VI) constituées de cystes avec une lumière centrale

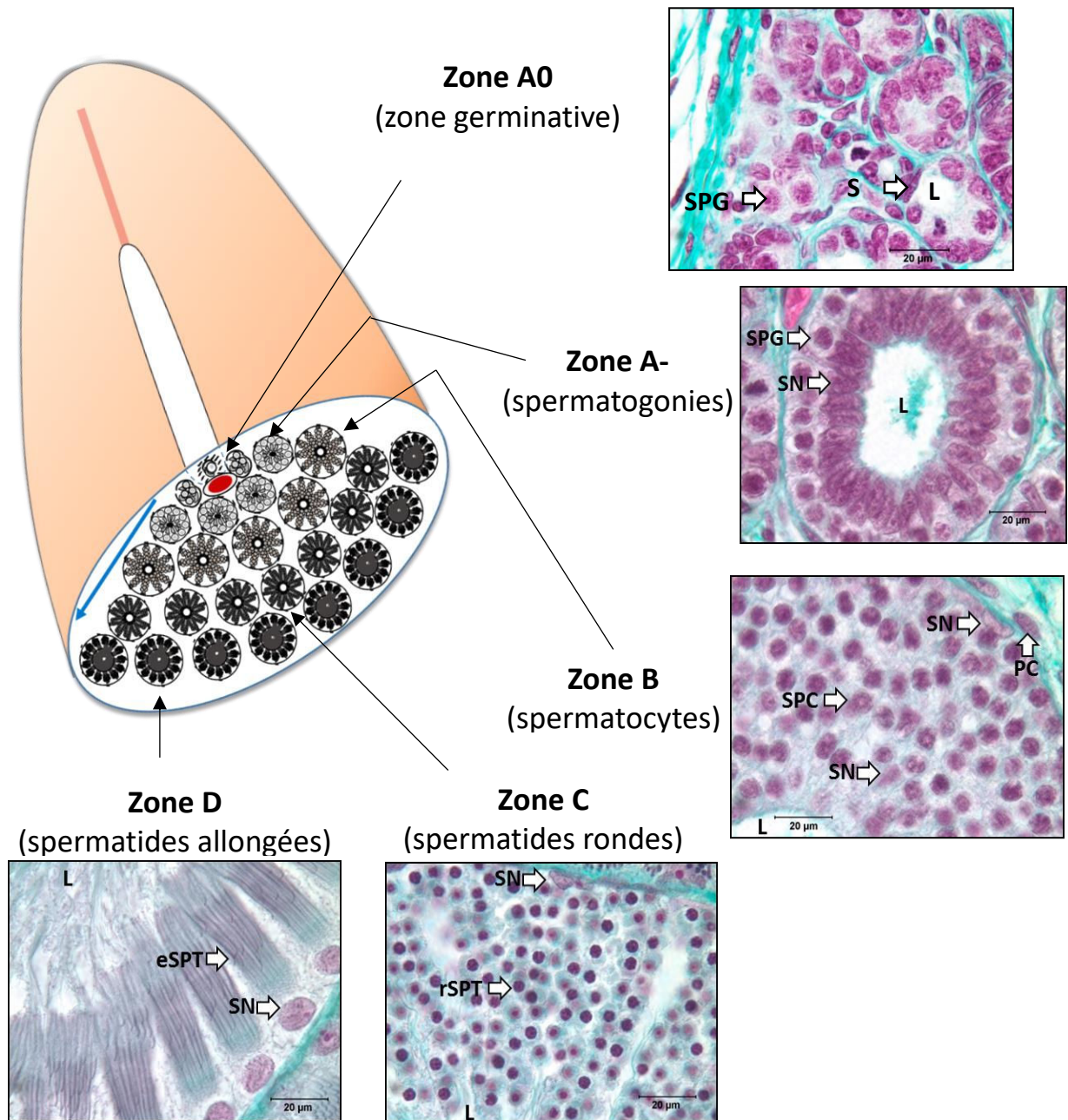


Figure 18 : Une organisation testiculaire cystique chez *Scyliorhinus canicula*.

Schéma représentant l'organisation testiculaire chez la petite roussette *S. canicula*. Le testicule est polarisé et peut être subdivisé en 5 zones appelées A0, A-, B, C et D. Des coupes histologiques illustrent l'organisation testiculaire au niveau de ces 5 zones. Elles permettent notamment de mettre en évidence l'organisation cystique du testicule observable dès la zone A-. SPG : spermatogonies, SN : noyau sertolien, L : lumière, SPC : spermatocyte, PC : cellule péricyctique, rSPT : spermatides rondes, eSPT : spermatides allongées. La flèche bleue désigne l'orientation de l'onde spermatogénétique au sein du testicule.

et la mise en place de cellules péricystiques en périphérie. Au stade IIIa, le cyste est complet, il compte alors entre 480 et 500 spermatoblastes (Stanley, 1966a). Un spermatoblaste est constitué initialement d'une cellule de Sertoli associée à une spermatogonie ; cette dernière va poursuivre sa prolifération, alors que la cellule de Sertoli cesse de se diviser, et aboutir à un clone de cellules germinales qui va se différencier au cours de la spermatogenèse. Au stade IIIa, les spermatogonies sont au niveau de la périphérie du cyste, chacune associée à une cellule de Sertoli dont les noyaux forment une couronne adluminale. C'est au stade IIIb que la première mitose permettant de générer deux spermatogonies par spermatoblaste est mise en évidence. Puis, entre le stade IV et le stade VI, trois mitoses spermatogoniales successives, vont permettre de former six rangées de spermatogonies par cystes, passant de 2 à 16 spermatogonies par spermatoblaste (Stanley, 1966b; Loir *et al.*, 1995). Au total, 13 mitoses spermatogoniales ont été estimées entre le stade I des pSSC et le stade VI des spermatocytes différenciées (Holstein, 1969). Le stade VI est caractérisé par le début de la migration des noyaux sertoliens de la zone adluminale vers la lame basale avec des noyaux majoritairement dans la zone intermédiaire. La prolifération spermatogonale importante induit également une augmentation du diamètre cystique de 89 μm à 171 μm (Sourdaine and Jégou, 1989). Lors de la dernière mitose spermatogonale de la zone A- (stade VI), les cellules germinales peuvent être considérées comme des spermatocytes pré-leptotènes. La zone B correspond à la zone testiculaire méiotique. Les cellules germinales de cette zone vont subir la première division méiotique réductionnelle permettant d'obtenir des spermatocytes secondaires haploïdes (stades IX et X) à partir des spermatocytes primaires diploïdes (stades VIIa et VIIb). Au stade VIIa, ces cellules rentrent en prophase de méiose, d'où la présence de spermatocytes au stade leptotène, zygotène et pachytène. Par la suite, se produit la fin de prophase de méiose avec des spermatocytes au stade diplotène (début de séparation des chromosomes) observables au stade VIIb. Au stade VIII, les cellules vont rentrer en métaphase, puis en anaphase et enfin en télophase de méiose afin de générer les spermatocytes secondaires constituant les cystes des stades IX et X (Mellinger, 1965). Durant cette première phase méiotique, les noyaux sertoliens contenus dans les cystes restent au niveau basal. On peut également observer une augmentation du volume des cystes avec un diamètre passant de 298 μm à 387 μm (Loir *et al.*, 1995). Dans la zone C, les cellules germinales vont finir leur processus méiotique en réalisant une division équationnelle permettant d'obtenir des spermatides rondes haploïdes

à une chromatide. Les stades XIa, XIb et XII sont principalement caractérisés par la présence des spermatides rondes dont le noyau à une forme muriforme (stade XIa) plus condensée avec une disposition des spermatides selon une image de feston (stade XIb) et enfin le stade XII avec le début de l'élongation des noyaux spermatiques en forme d'urne (Loir *et al.*, 1995). Enfin, la zone D, est composée des spermatides allongées et des cystes en cours de résorption. Au cours des stades XIII à XVI, la spermiogenèse se poursuit avec une condensation plus importante de la chromatine, la poursuite de l'élongation du flagelle et de la tête spermatique qui forme une hélice céphalique, la pièce intermédiaire comprenant le manchon mitochondrial est également observable à partir de stade XIII. Au stade XV, le cyste a atteint sa taille maximale d'environ 420 μm , les noyaux des cellules de Sertoli commencent à migrer vers le cytoplasme intermédiaire et les têtes spermatiques des faisceaux convergent entre elles. Aux stades XVI et XVII, les faisceaux de spermatides se compactent et se rapprochent de la lame basale, alors que les noyaux sertoliens se retrouvent perpendiculaires à la lame basale avec au stade XVII une proximité avec le corps protéique de Semper, inclusion ovoïde issue de fusion de granules protéiques, au niveau du cytoplasme intermédiaire. Enfin, les stades XVIIIa et XVIIIb, correspondant à la spermiation, sont caractérisés par le décrochage du faisceau spermatique qui entraîne avec lui la partie adluminale du cytoplasme sertolien. Les spermatozoïdes sont par la suite libérés dans la lumière du cyste puis évacués dans le canalicule collecteur, jusqu'alors obstrué par un bouchon cellulaire, reliant les cystes au tubule collecteur, intégré dans le tissu épigonal et qui longe ventralement le testicule (Dobson and Dodd, 1977a, b). Au cours de ces derniers stades, les cystes vont se résorber passant de 355 μm environ à 284 μm et les cellules de Sertoli vont dégénérer. Le tubule collecteur va par la suite se subdiviser en six canalicules efférents (équivalents au *rete testis*) qui se regroupent pour former le canal efférent permettant aux spermatozoïdes de rejoindre l'épididyme. Enfin, le canal déférent qui fait suite à l'épididyme s'élargit en ampoule séminale ce qui va permettre le stockage des spermatozoïdes matures compactés sous la forme de spermatozeugmata. Lors de l'accouplement le sperme sera alors éjaculé via la gouttière des ptérygopodes.

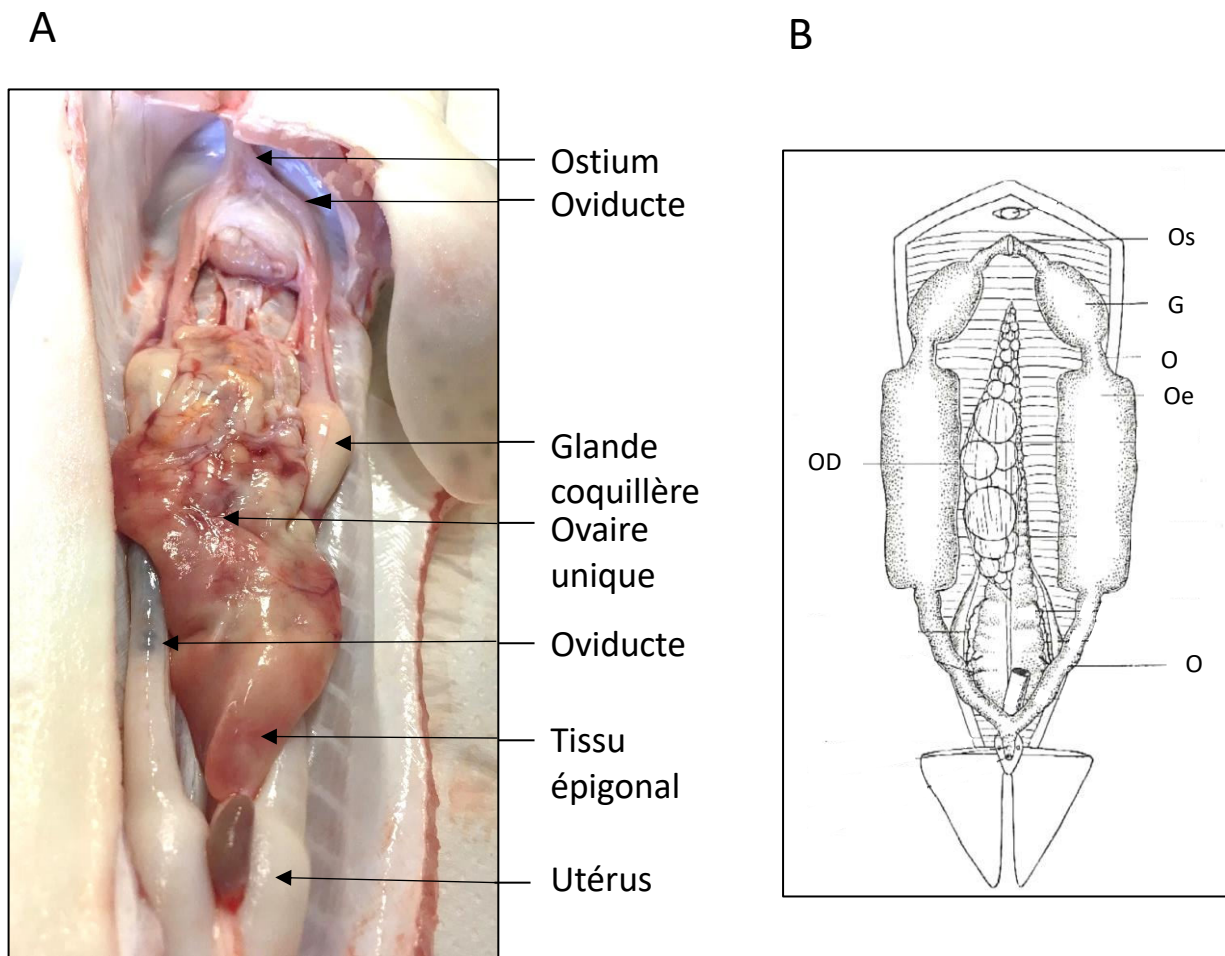


Figure 20 : Appareil génital femelle de la petite roussette *S. canicula*.

A : Photographie du tractus génital femelle chez *S. canicula* et mise en évidence des structures caractéristiques. **B** : Schéma représentatif du système génital. Os : Ostium, GC : glande coquillère, O : oviducte, Oe : Œuf, OD : ovaire droit. Schéma issu de Brien, 1958.

d. Un ovaire unique.

Chez la roussette femelle, l'ovaire est impair, seul l'ovaire droit est présent chez les individus adultes (Tixier and Gaillard, 1957). Il ne reste aucun vestige de l'ovaire gauche qui a régressé chez l'embryon dès le début de la différenciation morphologique (Thiebold, 1963) contrairement à la dissymétrie gonadique chez la poule, qui possède un ovaire vestigial dont la différenciation s'est arrêtée après la formation des tubes de première poussée (Thiebold, 1963). Chez *S. canicula*, l'ovaire droit présente un aspect différent selon l'état de maturité sexuelle de l'animal, il est plutôt lisse chez les individus immatures et relativement bosselé chez les individus matures, du fait qu'il soit rempli d'ovocytes en vitellogénèse (Tixier and Gaillard, 1957). Un mésentère le maintient au niveau dorsal. Comme chez les individus mâles, la gonade est rattachée à l'organe lymphomyéloïde, le tissu épigonal (Figure 20). La structure macroscopique et histologique de l'ovaire n'a pas été décrite chez *S. canicula*, mais au vu de nos observations, elle est très proche de celle observée chez d'autres requins ou raies comme *Carcharhinus falciformis*, *Rhizoprionodon terraenovae*, *Mustelus canis* ou encore *Zearaja chilensis* (Davenport *et al.*, 2011; Règo *et al.*, 2013) (Figure 21). Dans l'ovaire mature, sous l'épithélium cubique simple qui le recouvre, se trouvent des follicules à différents stades de maturation dispersés dans le tissu ovarien. Nous avons pu observer chez *S. canicula* que les follicules les plus précoces, les follicules primordiaux, étaient préférentiellement situés à proximité de l'épithélium. Au cours de l'ovogénèse, l'ovocyte est entouré d'une zone acellulaire appelée la zone pellucide, elle-même entourée par une puis plusieurs couches de cellules folliculaires appelée granulosa. La lame basale sépare la granulosa des cellules de la thèque interne et externe. Il est également important de souligner que les Chondrichthyens produisent des ovocytes matures de taille relativement importante pouvant atteindre un diamètre d'environ 100 µm et ayant une zone pellucide très développée jusqu'à plus de 70 µm (Davenport *et al.*, 2011), chez la petite roussette l'ovocyte mesure environ 200 µm (Mellinger, 2002). En revanche chez d'autres espèces comme l'homme, les ovocytes matures ne mesurent que environ 120 µm de diamètre (Griffin *et al.*, 2006). Cette grande taille d'ovocyte permet, aux espèces ovipares de Chondrichthyens lécithotrophiques, c'est-à-dire dont la seule source nutritive pendant le développement embryonnaire provient des réserves vitellines produites par le foie maternel et contenues dans le sac vitellin (Awruch, 2016), d'avoir une réserve nutritive suffisante pour leur bon développement. Les canaux de Müller constituent les

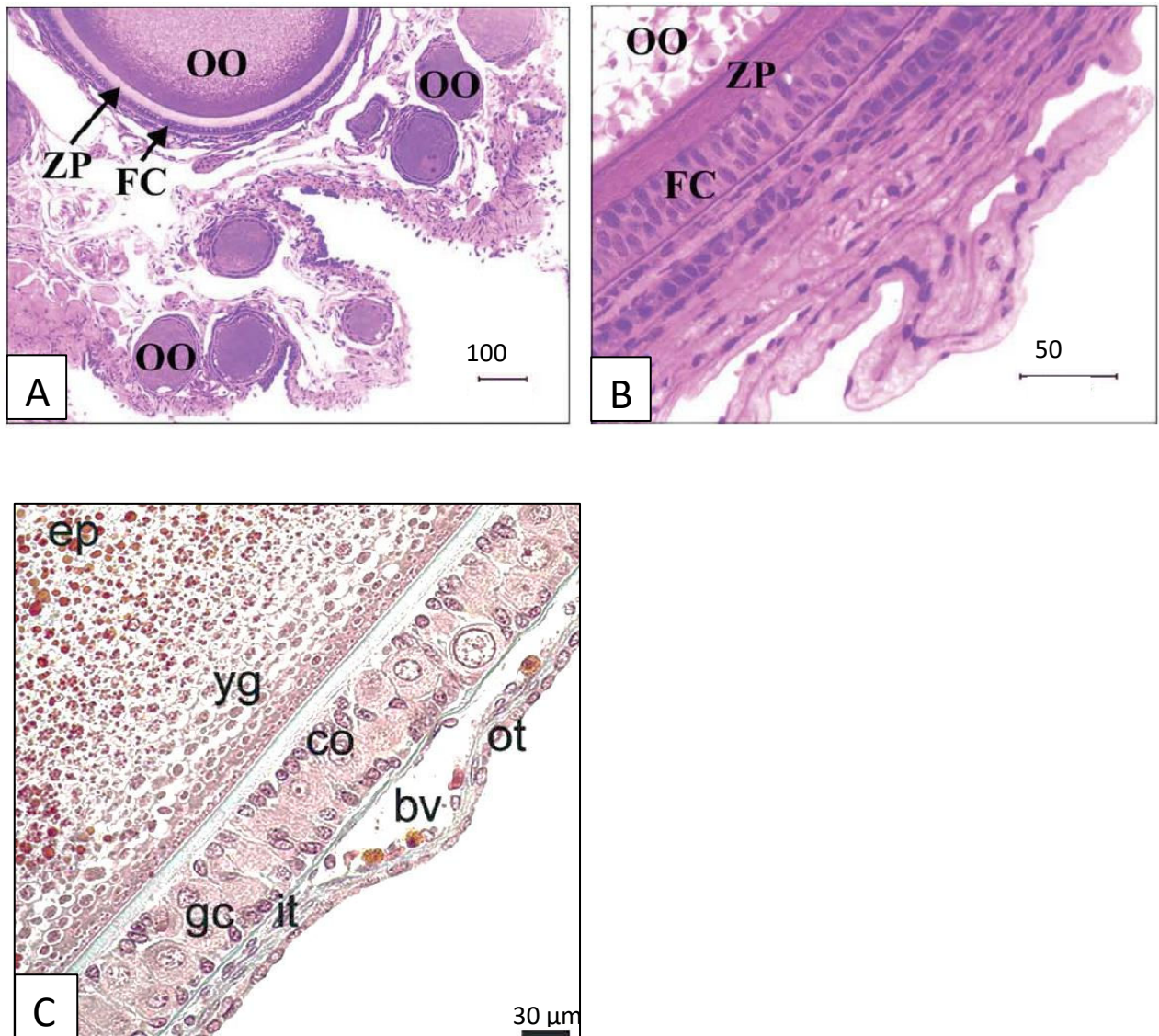


Figure 21: Organisation tissulaire et cellulaire des ovaires de deux espèces d'élastombranches.

A et **B** Coupes histologiques d'ovaire du requin *Rhizoprionodon terraenovae*. Les ovocytes (Oo) de petites tailles sont situés en périphérie de l'ovaire. Les ovocytes de grande taille sont composés de cellules folliculaires (FC) et présentent une zone pellucide (ZP). **C** : Coupe histologique d'ovocyte de raie *Zearaja chilensis*. L'ovocyte est constitué de différents types cellulaires qui composent la thèque externe (ot), la thèque interne (it) et la granulosa (co : petite cellules et gc : cellules intermédiaires). On retrouve également un vaisseau sanguin (bv) en périphérie, et au niveau interne la présence de granules vitellins (yg) et de plaque elliptique (ep). Figures A et B d'après Davenport *et al.*, 2011 et figure C d'après Wehitt *et al.*, 2015.

oviductes qui se réunissent au niveau antérieur et débouchent sur un pavillon unique (Thiebold, 1963). L'œuf est fécondé chez la petite roussette dans les glandes nidamentaires, dans la région antérieure de l'oviducte, qui ont un rôle de spermathèque. Cette glande va également générer une gelée protectrice autour de l'embryon, dont la composition et la fonction n'ont pas encore été déterminées de façon précise. Elle donne aussi aux œufs une coque cornée de forme quadrangulaire portant à chaque coin un filament contourné de même nature appelé « vrille ». Une fois encapsulés, les œufs passent dans l'utérus. Ces canaux utérins sont pairs et fusionnent dans la région médiane avant de déboucher sur le cloaque au niveau des papilles génitales (Tixier and Gaillard, 1957). Lors de la ponte, la femelle va fixer grâce aux vrilles les œufs qui sont généralement pondus par paire à un substrat algal dans la zone subtidale ou intertidale (Compagno, 1984).

Le stockage du sperme, suite à l'accouplement, a été rapporté chez des espèces d'Elasmobranches tant ovipares que vivipares comme l'émissole tachetée (Farrell *et al.*, 2010). Il est essentiel pour les espèces « nomades » qui se reproduisent seulement lorsqu'elles sont en contact (Awruch, 2016). Chez la petite roussette, le sperme peut être stocké jusqu'à plus de 2 ans (Dood *et al.*, 1983) et permet d'avoir une ponte d'œufs fécondés en continu même en absence de mâle dans les bassins. Dans le milieu naturel, les femelles sont capables de pondre des œufs de façon continue mais montrent un pic dans l'activité de ponte au mois de mai et une diminution de la ponte au mois d'octobre (Henderson and Casey, 2001).

e. Un développement embryonnaire lent

Le développement embryonnaire chez la petite roussette se déroule sur une période d'environ 6 mois post-ovoposition à 15°C (170-220 jours) (Ballard *et al.*, 1993). Cette durée est diminuée à une plus forte température (17°C) qui favorise le développement à *contrario* des eaux plus froides (11°C) (Ballard *et al.*, 1993). Les Chondrichthyens génèrent des œufs télolécithes caractérisés par un volume considérable de vitellus, avec une segmentation méroblastique, segmentation partielle qui n'affecte pas le pôle inférieur de l'œuf et de ce fait, la plus grande partie du vitellus n'est pas concernée par ce clivage, qui aboutit à la formation

Œuf post-ovoposition

Embryon à terme

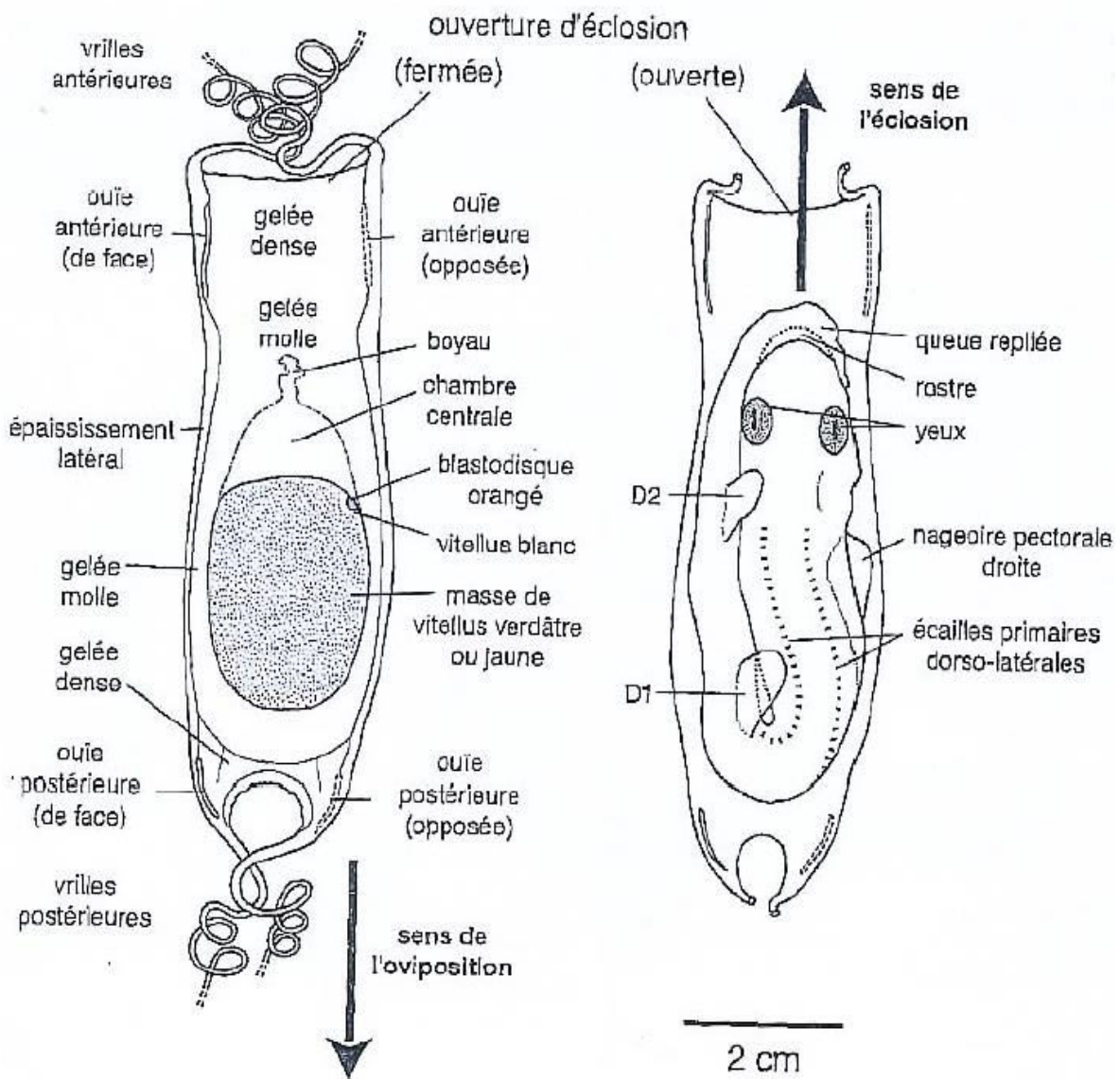


Figure 22 : Schéma d'œufs de petite roussette juste après l'ovoposition et à terme.

A gauche, l'embryon est très peu développé seul le blastodisque est observable au niveau du vitellus blanc. Le vitellus jaune est de taille importante et il est maintenu dans la capsule de l'œuf grâce à une gelée présentant différentes textures (molle et dense) suivant sa localisation. Aux deux extrémités de l'œuf se trouvent les vrilles permettant d'accrocher celui-ci à un support lors de l'ovoposition. A droite, l'œuf est à terme, l'embryon occupe toute la capsule et le vitellus n'est plus observable. La pré-éclosion a permis l'ouverture de la capsule au niveau de la partie angulaire pour permettre une entrée d'eau de mer plus importante lors des derniers stades de développement et la sortie de l'embryon lors de l'éclosion. Illustration issue de Mellinger, 2002.

d'un blastoderme. L'œuf est protégé dans une coquille qui est perméable à l'eau, aux électrolytes et aux petites molécules jusqu'à environ 2kDa (Hornsey, 1978; Foulley and Mellinger, 1980; Kormanik, 1993; Mellinger, 1994). On peut également noter au niveau de chacun des 4 angles de la coque la présence de fissures, qui s'ouvriront au stade 31, permettant une circulation d'eau de mer continue dans la coque. Elle sera plus importante et nécessaire en fin de développement (Ballard *et al.*, 1993; Mellinger, 1994) (Figure 22). A l'intérieur de l'œuf, la composition chimique de l'eau contenue dans la gelée interne est la même que celle de l'eau de mer ambiante (Kormanik, 1993), de ce fait l'embryon ainsi que ses annexes embryonnaires (vitellus et ses enveloppes) doivent assurer l'iono- et l'osmorégulation à tous les stades de développement (Kormanik, 1993). Par conséquent, l'ouverture de l'œuf lors de la pré-éclosion n'ajoute aucune contrainte d'environnement susceptible de perturber le bon développement de l'embryon mais permet à l'embryon de terminer son développement à l'abri des prédateurs.

Chez *S. canicula*, 34 stades de développement ont été décrits depuis la fécondation jusqu'à l'éclosion et répartis en 6 phases majeures (Ballard *et al.*, 1993) (Figure 23). La première phase comprend les stades 1 à 3 et se déroule dans l'oviducte avant l'ovoposition. Ces stades correspondent aux divisions des blastomères, le stade 1 comprenant la période entre la fécondation et l'apparition d'environ 100 blastomères, le stade 2 est caractérisé par la présence de plus de 100 blastomères mais l'absence d'un blastocèle. Au stade 3, les blastomères constituent un épithélium aplati et on observe la formation du blastocèle. A ce stade, la coquille contenant l'œuf se situe dans la partie caudale de l'oviducte prête à être pondue. La deuxième phase, correspond à la formation de l'embryon avant l'épibolie et la ponte de l'œuf. Elle comprend les stades 4 à 7 et est principalement caractérisée par la croissance du croissant postérieur qui atteint son maximum au stade 5 puis diminue en taille par la migration des blastomères au-dessous de celui-ci. C'est la première mise en place des mouvements morphogénétiques spécifiques de la gastrulation qui vont peu à peu engendrer la régression complète du croissant postérieur (stade 7). La troisième phase correspond à l'épibolie et la formation de l'embryon, elle est composée des stades 8 à 16. Dans les premiers stades (8-11), le blastodisque s'étend jusqu'à cacher entièrement le cercle de vitellus blanc, il est de forme ronde et peut être, dès le stade 12, observable dans l'œuf par transparence. Au

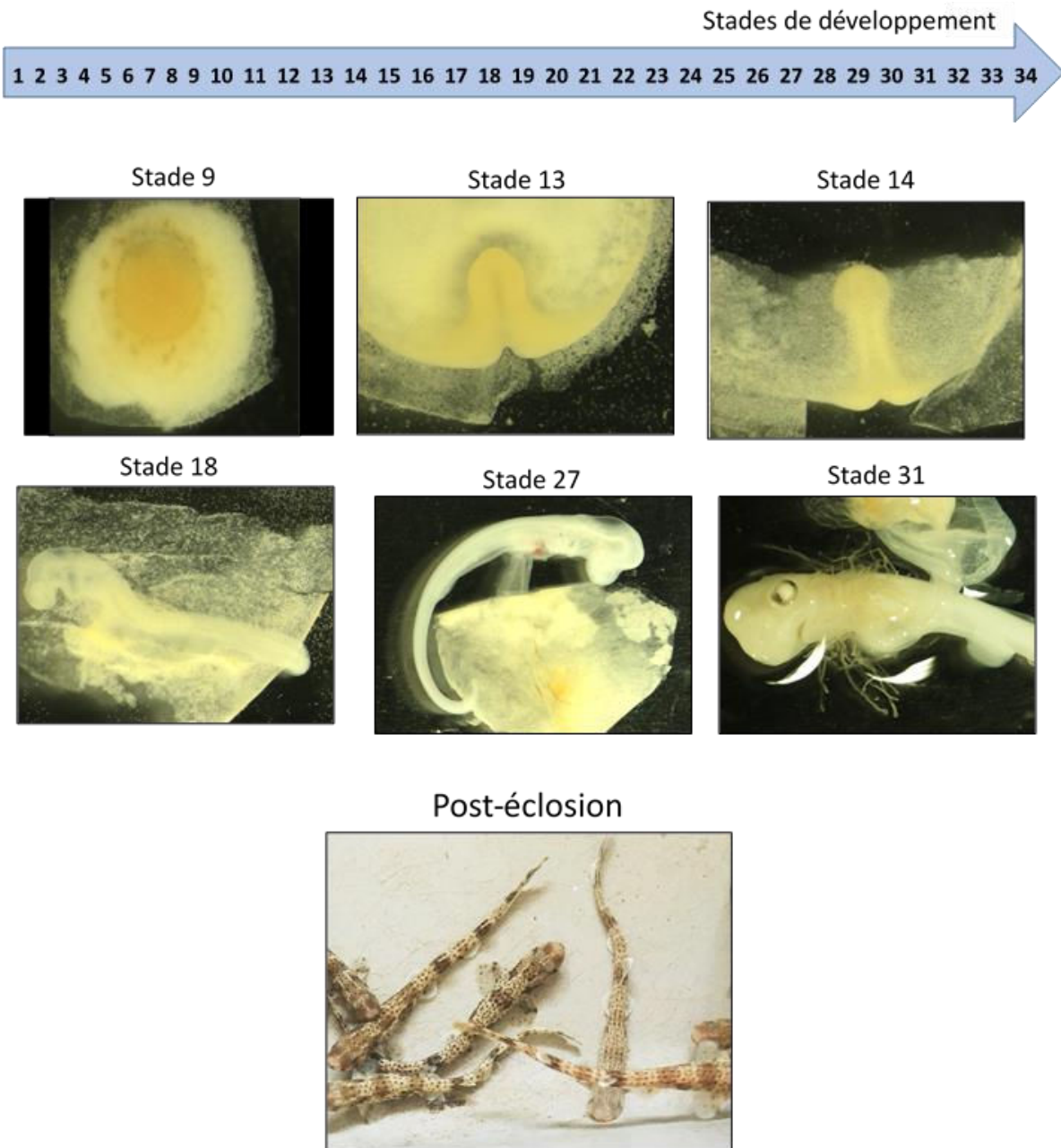


Figure 23 : Chronologie du développement de l'embryon de petite roussette.

Le développement embryonnaire de la petite roussette est divisé en 34 stades répartis sur environ 6 mois. Les photographies illustrent ici les stades 9 (8-9 jours), 13 (10-14 jours), 14 (11-15 jours), 18 (18-26 jours), 27 (41-44 jours), 31 (60-80 jours) et le stade post éclosion (145-175 jours). Stades d'après Ballard *et al.*, 1993.

stade 12, la formation d'une ligne postérieure, « le triangle notochondral », est observé, il forme le dessus d'une cavité à l'origine de la corde au niveau antérieur mais reste ouvert au niveau caudal. Deux bourrelets formant les bras mésodermiques sont aussi observables au niveau caudal de part et d'autre de la cavité notochondriale. Au stade 13, la fermeture des deux bras mésodermiques forme l'axe embryonnaire, qui montre au stade 14 un élargissement au niveau de la tête. Enfin, au stade 15 on observe la formation des premiers somites, et au stade 16, au niveau antérieur, la formation du neuropore. La phase suivante, est caractérisée par la métamérisation pharyngienne, la mise en place des derniers somites et les premiers mouvements de motilité (stades 17-26). En effet dès le stade 17 sont décrits des mouvements latéraux, rythmiques, aneuxaux de l'embryon rappelant que les muscles striés squelettiques des Vertébrés ont à l'origine une activité autonome, que l'innervation directe peut faire disparaître par la suite (Mellinger, 1994). Au stade 17, l'embryon qui est rattaché ventralement au vitellus, a la tête qui se soulève du sac vitellin et on peut noter la mise en place des premières poches pharyngées. Les poches pharyngées vont continuer de se développer jusqu'au stade 26 où elles formeront les fentes pharyngées. Au stade 19, on peut également souligner la formation de la bouche. Enfin, au stade 26, toutes les fentes pharyngiales sont ouvertes, et l'ensemble des somites sont présents. L'avant dernière phase comprenant les stades 27 au stade 31 correspond au développement des branchies jusqu'au stade pré-éclosion. Au stade 27, les filaments branchiaux apparaissent dans les fentes pharyngiales et la bouche en forme de diamant commence à s'ouvrir sur l'extérieur. Au stade 28, la bouche s'allonge pour avoir une forme ovale, la formation buccale se prolonge au stade 29. Au stade 30, on observe la pigmentation des yeux, la mise place des nageoires avec l'émergence de la nageoire anale. Enfin, au stade 31, le rostre se forme et la glande de l'éclosion est activée permettant la digestion de la gelée et l'ouverture des quatre fentes de l'œuf par digestion du ciment spécial qui les maintenait fermées jusqu'alors. De plus, le vitellus commence à être transféré du sac vitellin externe vers un sac vitellin interne. La dernière phase correspond à la période comprise entre la pré-éclosion et l'éclosion (stades 32 à 34) où le rostre devient plus proéminent et forme un angle de 90° avec le corps de l'embryon (stade 32). Puis, le sac vitellin externe diminue fortement (stade 33) pour enfin être vidé au stade 34, le fœtus remplit alors toute la coque et est prêt à éclore en sortant par l'ouverture, située à l'extrémité quadrangulaire de la coque. Lors de l'éclosion, les alevins ont une taille comprise entre 9 et 11 cm (Mellinger, 1994).

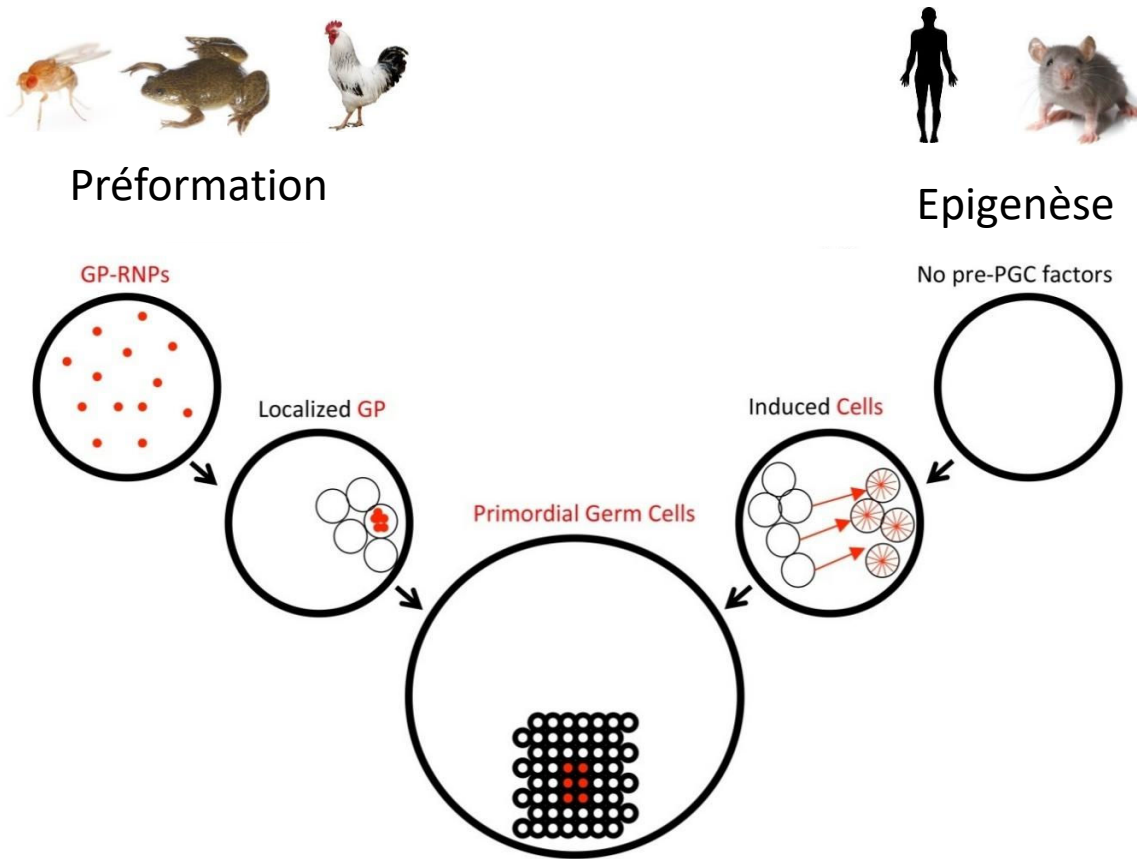


Figure 24 : Mécanismes de spécification des cellules germinales par épigénèse et par préformation.

Deux principaux mécanismes de spécification des cellules germinales ont été mis en évidence. Un mécanisme de préformation décrit notamment chez la drosophile, le xénope et le poulet, et le mécanisme d'épigénèse décrit chez les mammifères. La spécification des cellules germinales par préformation se fait par la transmission maternelle de ribonucléoprotéines (RNPs) présentes dans le germoplasme (GP). Le mécanisme de spécification par épigénèse est quant à lui basé sur l'induction des cellules germinales par les cellules zygotiques environnantes. Adapté d'après Eno *et al.*, 2016.

f. Une différenciation gonadique peu caractérisée

Chez les animaux à reproduction sexuée, les gamètes proviennent d'une petite population de cellules apparaissant très tôt dans le développement embryonnaire, les cellules germinales primordiales (PGCs). Les différentes données obtenues à partir des organismes modèles ont montré deux types principaux de spécification des cellules germinales (Figure 24). La première appelée préformation, est précoce au cours du développement et a notamment été décrite chez la drosophile et une majorité de poissons Téléostéens. Dans ce premier cas, la spécification des cellules germinales est assurée par la transmission de déterminants maternels et leur répartition particulière dès les premières divisions cellulaires (Extavour and Akam, 2003). Parmi ces déterminants maternels, on retrouve l'ARN messager de *vasa* (Braat *et al.*, 1999) ou encore celui du gène *nanos* (Gavis *et al.*, 2008), dont les 3'UTR particuliers permettent leur stabilisation (désadénylation, modification de la longueur de la queue PolyA, ...) (Mishima and Tomari, 2016) et l'expression des transcrits jusqu'à la transition blastulienne (Barckmann and Simonelig, 2013), mais également des protéines maternelles comme Nanos et Dazl (Koprunner *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Un deuxième mode de spécification des cellules germinales, par épigénèse, a été décrit chez les Mammifères par exemple. Il est plus tardif dans le développement (gastrula) et est induit par des signaux des tissus environnants (Extavour and Akam, 2003). En effet chez l'embryon de souris, les cellules de l'épiblaste distal, qui se différencient normalement en dérivés ectodermiques, se différencient en PGCs une fois transplantées dans l'épiblaste proximal (Tam and Zhou, 1996). Il a également été montré que les BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), qui font partie de la super-famille des protéines TGF β permettent la spécification des cellules germinales chez la souris, en l'occurrence BMP4 (Lawson *et al.*, 1999). Chez les Chondrichtyens, les deux types de spécification des cellules germinales ont déjà été décrits (pour revue, Extavour and Akam, 2003) mais cette question reste inexplorée chez la petite roussette.

Une fois déterminées, les cellules germinales primordiales migrent ensuite jusqu'aux crêtes génitales via des migrations passives mais également des migrations actives. Les mouvements cellulaires sont guidés par les cellules à proximité, la matrice extracellulaire ou encore des mécanismes intrinsèques qui coordonnent des changements cytosquelettiques et les propriétés adhésives des cellules en mouvement. Néanmoins les voies de migration peuvent varier en fonction des espèces (Starz-gaiano and Lehmann, 2001). Si l'on s'intéresse par

exemple au poisson-zèbre qui a un développement rapide, les PGCs migrent en marge de l'épibolie puis forment deux groupes de migration de part et d'autre du corps embryonnaire. Par la suite, les deux groupes de PGCs migrent le long du corps embryonnaire vers la région antérieure au niveau du primordium gonadique (Richardson et Lehmann, 2015). Chez la poule en revanche, les PGCs se déplacent grâce au système vasculaire puis migrent dans le mésoderme intermédiaire pour enfin rejoindre le primordium gonadique (Nakamura *et al.*, 2007). Il existe donc plusieurs voies migratoires possibles. De plus, chez le poisson-zèbre au cours de leur migration, les PGCs alternent des phases migratoires et des phases d'arrêt pendant lesquelles les cellules perdent leur polarité (pour revue, Richardson et Lehmann, 2015). Les cellules migratrices montrent une polarité directionnelle, où le mouvement est induit par la protrusion et l'adhésion de la partie avant de la cellule alors qu'une rétractation de l'adhésion au niveau de l'arrière de la cellule est observée (Blaser *et al.*, 2005). Ce processus est régulé par des récepteurs transmembranaires qui reçoivent des signaux chimio-attractants, qui déclenchent une réorganisation du cytosquelette par des molécules effectrices comme les phospholipides et les petites GTPases (pour revue, Richardson et Lehmann, 2015). Parmi les molécules chimio-attractantes, les principales molécules de guidage caractérisées sont SDF-1 et son récepteur CXCR4. Ce couple a déjà été décrit chez de nombreuses espèces comme l'humain (Lapidot and Kollet, 2002), le poisson-zèbre (Doitsidou *et al.*, 2002) ou encore le xénope (Takeuchi *et al.*, 2010). Si l'on garde l'exemple du poisson zèbre, l'ARNm de SDF-1 est exprimé tout au long du trajet migratoire des cellules germinales, et la diminution de l'expression de SDF-1 ou de son récepteur CXCR4 engendre des défauts de migration des PGCs entraînant une localisation ectopique des cellules germinales au sein de l'embryon (Doitsidou *et al.*, 2002). D'autres voies de migration ont aussi été décrites chez le poisson-zèbre comme celle de Hmgcr impliquée dans l'ajout d'un groupe isoprénoïde (géranylation) des sous unités G γ requises pour le fonctionnement des récepteurs couplés aux protéines G des PGCs. A l'heure actuelle, aucune étude n'a montré de manière concrète comment les cellules germinales migraient dans le primordium gonadique chez la petite roussette.

Chez *S. canicula*, quelques études se sont portées sur l'organogénèse gonadique (Thiebold, 1963). Chez l'embryon de 7 à 8 mm, correspondant au stade 21 de Ballard *et al.*, les cellules germinales sont pour la plupart situées dans l'angle dorsal du mésentère, intercalées parmi

les cellules épithéliales de la splanchnopleure. La majorité de ces cellules est retrouvée au niveau des somites post-otiques 14 à 23 du côté droit comme du côté gauche. On retrouve le même type de disposition aux stades 22-26. Chez les embryons au stade 27 (13-14 mm), le pli gonadique est apparent. Il est issu d'une invagination dans la cavité péritonéale de la partie de l'épithélium coelomique colonisé par les cellules germinales. Cependant aucune différenciation sexuelle n'est encore décelable. C'est seulement à des stades plus tardifs 28-29 (16-17mm) que cette ébauche est bien individualisée entre le 12^{ème} et la 25^{ème} somite post-otique avec un développement maximum au niveau de la 17^{ème} et de la 18^{ème} somite. Enfin, aux stades 29-30, les premiers caractères morphologiques distincts entre les mâles et les femelles sont notables au niveau gonadique. En effet, la gonade de l'embryon de roussette est formée de deux tissus somatiques : le cortex et la médulla. La différenciation gonadique mâle se fait par la migration dans le tissu médullaire des éléments germinaux primitivement logés dans l'épithélium germinatif alors qu'il n'y a pas de migration médullaire chez la femelle (Thiebold, 1963). Dans un premier temps, cette migration entraîne la totalité des éléments germinaux qui se retrouvent isolés dans la médulla, éparpillés dans un massif de petites cellules épithéliales. Puis, dans un second temps, un remaniement de ces éléments germinaux va permettre de former les cordons sexuels et les ampoules germinales, lieu de la spermatogenèse. Chez la femelle, toutes les cellules germinales restent dans le cortex où un grand nombre d'entre elles vont entrer en début de la prophase méiotique. Le dimorphisme sexuel apparent des gonades se place de ce fait à un stade particulièrement précoce, marqué par le début de la migration des éléments germinaux dans l'ébauche mâle (Thiebold, 1963). Au niveau cellulaire, une étude montre l'initiation de la méiose chez les embryons femelles au stade 31 (Thiebold, 1963) mais la cinétique de différenciation gonadique reste à préciser au cours de l'embryogenèse et chez les juvéniles.

4. Objectifs

L'objectif de cette thèse est double. La première partie porte sur la caractérisation des cellules souches spermatogoniales (SSCs) et de leur niche chez la petite roussette *Scyliorhinus canicula*. La seconde, réalisée dans le cadre d'une convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE) avec l'entreprise KELIA, porte sur la caractérisation de molécules à potentiel thérapeutique issues du testicule de petite roussette.

Les SSCs sont des cellules très conservées au cours de l'évolution et cruciales pour la fertilité des individus. Les diverses applications médicales et agronomiques qui émergent de l'utilisation de ces SSCs expliquent l'essor des recherches sur ces cellules cette dernière décennie tant chez des espèces modèles comme la souris et le poisson zèbre (Leal *et al.*, 2009) que chez des espèces d'intérêt agronomique comme la sériole et le cheval (Costa *et al.*, 2012; Morita *et al.*, 2012). Parmi les Vertébrés, la classe des Chondrichthyens fait d'objet de peu d'études sur ce sujet alors que sur le millier d'espèces qu'elle comprend, environ un quart sont en danger d'extinction et seulement un tiers est considéré comme non vulnérable (Dulvy *et al.*, 2014). Des recherches ont donc été initiées au sein du laboratoire BOREA pour explorer la niche des SSCs chez un requin abondant localement, la petite roussette *Scyliorhinus canicula*. Ainsi, des SSCs potentielles ont été identifiées et caractérisées au niveau morphologique (Loppion *et al.*, 2008) et moléculaire (Loppion *et al.*, 2008; Redon *et al.*, 2010) avec l'identification de premiers marqueurs, POU2 et GFR α 1 aux profils d'expression restreints aux spermatogonies indifférenciées, ou c-Kit et PLZF aux profils d'expression plus larges (Bosseboeuf *et al.*, 2014a). Enfin, les cellules germinales de la zone germinative ont pu être maintenues en culture à long terme, une caractéristique propre des cellules souches, en présence de GDNF. Un modèle de niche germinale testiculaire de petite roussette a donc été établi *in vitro* (Gautier *et al.*, 2014).

Au cours de cette thèse, mon premier objectif a donc été de poursuivre la caractérisation moléculaire des SSCs de petite roussette sur la base de facteurs germinaux comme Nanos mais aussi de marqueurs de pluripotence comme Sox2 ou SSEA4. Suite à l'identification de deux transcrits de *nanos1* chez la roussette, l'histoire évolutive de ce facteur a été explorée chez

les Vertébrés. Puis, afin de démontrer *in vivo* le caractère souche des cellules cultivées, des travaux ont été menés pour établir un test fonctionnel de transplantation chez l'embryon. En parallèle, le fonctionnement de la niche germinale a été abordé du point de vue des chimiokines permettant de guider les PGCs au primordium gonadique, d'assurer le « homing » des SSCs et de favoriser la colonisation des SSCs suite à une transplantation. Le couple ligand/récepteur SDF-1/CXCR4 a donc retenu notre attention pour cette étude.

La petite roussette représente également un modèle d'intérêt dans la recherche de molécules à potentiel thérapeutique. Malgré leur divergence précoce au sein des Vertébrés, des mécanismes physiologiques et moléculaires décrits chez les Mammifères ont également été retrouvés chez les Chondrichtyens. On peut notamment relever que ce sont les premiers Vertébrés à avoir développé un pancréas distinct composé des mêmes types cellulaires que ceux présents chez les Mammifères. Au niveau moléculaire, des études ont aussi confirmé les propriétés hypoglycémiantes de l'insuline chez deux requins (Anderson *et al.*, 2002). Enfin, une étude récente menée chez *S. canicula* a permis d'identifier le glucagon like peptide et a démontré sa capacité à réguler la glycémie chez des souris atteintes de diabète de type 2 (O'harte *et al.*, 2016). Ces résultats mettent donc en exergue une conservation des mécanismes de régulation glucidique entre les Mammifères et les Chondrichtyens.

Dans le cadre du projet PEPTISAN mené en amont de ma thèse, en collaboration avec le laboratoire KELIA Pharma, un criblage large de peptides issus de différents tissus de *S. canicula* a été réalisé en se focalisant sur leur potentiel à réguler le métabolisme glucidique ou à réguler la prolifération de cellules cancéreuses. Cette étude a permis de mettre en évidence plusieurs peptides issus du testicule de petite roussette potentiellement intéressants. Mon objectif a donc été de caractériser plus précisément l'effet anti-cancéreux ou anti-diabétique de cinq peptides issus du testicule par des approches *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre 1

CHAPITRE 1

The nanos1 gene was duplicated in early Vertebrates and the two paralogs show different gonadal expression profiles in a shark.

**Laura GRIBOUVAL ; Pascal SOURDAINE ; Jean-Jacques LAREYRE ; Johanna BELLAICHE ;
Florence LE GAC ; Sylvie MAZAN ; Cécile GUIARDIERE ; Pierrick AUVRAY ; Aude GAUTIER**

(Scientific Reports, en révision)

La classe des Chondrichthyens, apparue il y a environ 420 millions d'années, comprend les requins, les raies et les chimères, et est le groupe frère des Ostéichthyens. Cette position phylogénétique spécifique rend leur étude particulièrement intéressante dans une perspective évolutive. De plus, certaines de ces espèces présentent une organisation testiculaire polarisée et cystique, en faisant d'excellents modèles pour l'étude de la niche germinale, d'une importance majeure pour la production de gamètes chez le mâle. Lors de précédents travaux, des spermatogonies souches potentielles ont été identifiées et caractérisées au niveau morphologique chez la petite roussette, *Scyliorhinus canicula*, une espèce locale et non vulnérable de requin. Une première caractérisation moléculaire a aussi été initiée avec l'expression des récepteurs c-Kit, GFR α 1 et Pou2 dans ces cellules. L'objectif de ces travaux était de poursuivre la caractérisation des spermatogonies de petite roussette en étudiant l'expression d'une famille de protéines de liaison à l'ARN, les protéines Nanos dont le rôle crucial pour le maintien du lignage germinal, tant chez le mâle que chez la femelle, est conservé chez les métazoaires.

Au cours de cette étude, des analyses *in silico* par blast sur des banques transcriptomiques de petite roussette ont révélé deux transcrits, tous deux homologues de *nanos1*. De plus, un accès récent au génome a permis d'identifier également les homologues de *nanos2* et *nanos3*. Une étude de synténie a montré que les deux formes de *nanos1* identifiées correspondaient à deux gènes distincts, également présents chez d'autres Chondrichthyens ainsi que chez des espèces représentatives des Sarcoptérygiens et des Actinoptérygiens ancestraux, telles que le coelacanthe et le lépisosté tacheté. Ainsi, au cours de l'évolution des Vertébrés, le gène *nanos1* a subi une duplication générant deux paralogues nommés *nanos1A* et *nanos1B*. Les Amniotes ainsi que les poissons téléostéens ne possèdent en revanche qu'une seule forme de *nanos1*, mettant ainsi en évidence les pertes respectives de *nanos1B* et de *nanos1A* en amont de ces clades. Les profils d'expression des deux paralogues de *nanos1* ont ensuite été caractérisés chez la petite roussette. Des analyses par hybridation *in situ* et immunohistochimie dans l'ovaire et le testicule ont révélé des profils d'expression différents entre les deux formes. Nanos1A est exprimé de façon ubiquiste dans les cellules germinales testiculaires alors que Nanos1B est exclusivement exprimé dans les spermatogonies. De plus, Nanos1A présente une expression cytoplasmique, tandis que Nanos1B présente préférentiellement une expression nucléaire. Dans l'ovaire, Nanos1A et

Nanos1B présentent des profils d'expression similaires dans les cellules germinales précoces et les cellules folliculaires lors de la vitellogenèse. Ces travaux révèlent donc une duplication du gène *nanos1* à la base des Vertébrés et leurs profils d'expression différents chez la petite roussette ouvrent un questionnement sur le rôle de ces deux formes au niveau testiculaire et ovarien.

The *nanos1* gene was duplicated in early Vertebrates and the two paralogs show different gonadal expression profiles in a shark.

AUTHORS

Laura GRIBOUVAL^{1,2}; Pascal SOURDAINE¹; Jean-Jacques LAREYRE³; Johanna BELLAICHE³; Florence LE GAC³; Sylvie MAZAN⁴; Cécile GUIARDIERE²; Pierrick AUVRAY²; Aude GAUTIER^{1*}

AFFILIATION

¹ Normandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), CS14032, 14032 CAEN, Cedex 5, France

² KELIA, Parc Technopolitain Atalante Saint Malo, 35400 Saint Malo, France

³ INRA UPR1037, Laboratory of Fish Physiology and Genomics, BIOSIT, Ouest-Genopole, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

⁴ CNRS-UPMC-Sorbonne Universités, UMR 7232, Observatoire océanologique, 66650 Banyuls sur mer, France

* Corresponding author: aude.gautier@unicaen.fr

KEYWORDS

Nanos, gene evolution, Chondrichthyes, dogfish, gonads

Abstract

Nanos are RNA-binding proteins playing crucial roles in germ cell development and maintenance. Based on phylogenetic and synteny analyses, this study reveals that *nanos1* gene has undergone multiple duplications and gene copies losses in Vertebrates. Chondrichthyan species display two *nanos1* genes (named *nanos1A/1B*), which were both retrieved in some Osteichthyes at basal positions in Sarcopterygii and Actinopterygii lineages. In contrast, Teleosts have lost *nanos1A* but duplicated *nanos1B* leading to the emergence of two ohnologs (*nanos1Ba/1Bb*), whereas Tetrapods have lost *nanos1B* gene. The two successive nanos gene duplications may result from the second and third whole genome duplication events at the basis of Vertebrates and Teleosts respectively. The expression profiles of *nanos1A* and *nanos1B* paralogs were characterized in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Nanos1A* was strongly expressed in brain and also localized in all germ cell types in the polarized testis. In contrast, *nanos1B* was detected in testis with the highest expression in the germinative zone. In addition, Nanos1B protein was predominantly located in the nuclei of male germinal cells. In the ovary, both paralogs were detected in germinal and somatic cells. Our study opens new perspectives concerning the complex evolution of *nanos1* paralogs and their potential distinct roles in Vertebrates gonads.

Introduction

The Nanos proteins family regroups highly conserved RNA-binding proteins in higher eukaryotes implicated in germ cell development and maintenance. Nanos family is characterized by two specific Cys-Cys-His-Cys zinc finger motifs at the carboxy-terminal region which present a regular spacing between the Cys and the His residues. These motifs are indispensable for Nanos function (Arrizabalaga and Lehmann, 1999). They can bind to the 3'untranslated region (3'UTR) of target messenger RNAs (mRNAs) in order to regulate gene expression post-transcriptionally with no sequence specificity but by potential electrostatic interactions with the phosphate backbone of RNA (Curtis *et al.*, 1997; Hashimoto *et al.*, 2010). For example, in the mouse, NANOS2 plays a role in meiosis suppression by preventing Stra8 expression in male foetal gonads (Suzuki and Saga, 2008).

Nanos has been first identified in *Drosophila melanogaster* as a maternal gene crucial for abdomen formation (Lehmann and Nusslein-volhard, 1991) and for germ cells implantation (Kobayashi *et al.*, 1996). In Vertebrates, three *Nanos* paralogous genes were described. In *Xenopus*, knockdown of *Nanos1* induced the loss of Primordial Germ Cells (PGCs) (Lai *et al.*, 2012) and in zebrafish the absence of Nanos3 disturbed PGCs migration and decreased their number (Kopranner *et al.*, 2016). In mice, the suppression of Nanos3 expression in PGC resulted in the complete loss of germ cells in both sexes (Tsuda *et al.*, 2003). NANOS2 has also been identified as a key stem cell regulator in Spermatogonial Stem Cells (SSC) of mature individuals by maintaining the stem cell fate during spermatogenesis in mice (Sada *et al.*, 2009b). A role of this gene in Germinal Stem Cells maintenance may be evolutionarily conserved as Nanos2 is specifically expressed both in oogonia and in spermatogonia of adult medaka (Aoki *et al.*, 2009) and in a subpopulation of undifferentiated A spermatogonia in juvenile and spermiating male trout (Bellaiche *et al.*, 2014). Taken together, these data identify *Nanos* as primordial genes with highly conserved functions for both, the migration of the germinal cells and their maintenance in adults.

In Vertebrates, *Nanos* paralogous genes were associated to partial redundancies and specific functional evolutions. For example, in mice, *Nanos1* was predominantly expressed in the central nervous system and in adult gonads but *Nanos1*^{-/-} mice developed normally and were fertile (Haraguchi *et al.*, 2003). In contrast, a mutation of *NANOS1* led to male infertility in human (Kusz-Zamelczyk *et al.*, 2013). On the other hand, while *NANOS2* and *NANOS3* were crucial for the germ cell lineage establishment in mice (Tsuda *et al.*, 2003), mutations of these genes in humans did not cause infertility (Kusz *et al.*, 2009a, b).

In teleostean fish, two *nanos1* genes were generated, probably during the Teleost specific whole genome duplication (3R). In medaka, *in situ* hybridization revealed that the two forms of *nanos1* gene showed specific expression patterns in developing brain and sensory organs. These two transcripts showed a differential expression in the gonad: *nanos1a* was expressed in the somatic cells surrounding oocytes and in male meiotic cells unlike *nanos1b*, which was not detectable (Aoki *et al.*, 2009). All these studies illustrate the complexity and the diversity of *nanos* gene expression patterns and functions through Vertebrates evolution.

Because of their phylogenetic position as sister group of Osteichthyes, Chondrichthyes represent models of interest to gain insight into gene evolution in jawed Vertebrates. For this purpose, genomic and transcriptomic data are progressively available in holocephalans, in the elephant shark, *Callorhinchus milii* (Venkatesh *et al.*, 2014) and in Elasmobranchs, in the whale shark *Rhincodon typus* (Read *et al.*, 2015) and in the little skate *Leucoraja erinacea* (Wang *et al.*, 2012b; Wyffels *et al.*, 2015). Unpublished transcriptome libraries were also produced from another elasmobranch, the small-spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula* (Redon *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2013). Molecular and cellular data concerning the reproduction of these species are very limited whereas one quarter of Chondrichthyes are threatened according to the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) Red List criteria (Dulvy *et al.*, 2014). Our model, *Scyliorhinus canicula*, is a non-vulnerable shark present in abundance in the English Channel. Females present a unique ovary containing follicles at

different stages of maturation. Males display polarized testes, organized in cysts, allowing a precise description of the expression pattern of specific genes during the spermatogenic progression. Indeed, the testis can be subdivided in five testicular zones specific to the different areas of spermatogenesis: the zone A0 containing the potential Spermatogonial Stem Cells (SSC) in a dense somatic tissue, and the other areas made of cysts containing respectively differentiating spermatogonia (zone A-), spermatocytes (zone B), round spermatids (zone C) and elongated spermatids (zone D) (Lair and Sourdaire, 1994b). This particular organization allowed us to evaluate more precisely the stage-specific expression of particular transcripts and proteins during spermatogenesis (Loppion *et al.*, 2008; Bosseboeuf *et al.*, 2014b).

In this study, we identified in *Scyliorhinus canicula* transcriptomes two sequences which both segregated with the Nanos1 proteins subfamily. This finding led us to investigate their origin and evolution in Vertebrates using phylogenetic reconstructions and analyses of syntenic chromosomal fragments. These analyses revealed multiple duplications and losses of *nanos1* gene copies during Vertebrates evolution. The expression profile of these two paralogs was next characterized in a representative of basal Gnathostomes, the dogfish, in a panel of tissue by RT-PCR and in the gonads by immunohistochemistry and *in situ* hybridization on mature males and females. The two gene copies, termed *nanos1A* and *nanos1B*, were both detected in germinal and somatic cells in the ovary, whereas they showed different germinal distribution in testis. This work shows that *nanos1* genes in Sarcopterygians and Teleosts provide an example of hidden paralogy, and describes for the first time the distinct expression profiles of the two *nanos1A* and *nanos1B* paralogs using a shark.

Results

Multiple *nanos1* paralogs exist in Vertebrates.

The identification of *nanos* sequences in *Scyliorhinus canicula* was carried out from different dogfish cDNA banks generated from ovary, testis and a pool of embryos, juveniles and adult tissues. Two

different complete cDNA sequences were found using the TBLASTN algorithm and mouse NANOS proteins as queries. A phylogenetic analysis showed that both dogfish sequences segregated with Nanos1. A first sequence showed highest similarity with the mammalian NANOS1 proteins (termed Nanos1A) whereas the second one was similar to the teleostean Nanos1 proteins (termed Nanos1B). This result raised the question of the timing of this gene duplication relative to the Gnathostomes radiation. In order to address this issue, *nanos1* sequences were first searched in other chondrichthyan species. Concerning Elasmobranchs, both *nanos1* gene copies were found in the whale shark *Rhincodon typus* genome and in the little skate *Leucoraja erinacea* genome and transcriptome (SkateBase: *nanos1A*, LS-transcript-ctg90798; *nanos1B partial sequences*, LS-transcript-ctg92973 and LS-transcriptB2-ctg57931). In the chimaera *Callorhinchus milii*, only *nanos1A* was found. The search for *Nanos1* genes was then extended to other vertebrates and additional *nanos1* gene copies were determined based on phylogenetic and genomic environment analyses. The conserved neighbouring genes of *nanos1A* and *nanos1B* were mapped in the genome of representative vertebrate species: Agnatha (sea lamprey), Chondrichthyes (dogfish, whale shark, chimaera/elephant shark) and Osteichthyes, including Sarcopterygii (coelacanth, *Xenopus tropicalis*, green anole, chicken and human) and Actinopterygii (spotted gar, arowana, zebrafish, rainbow trout and stickleback) (Figure 1). The *nanos1A* synteny was found in Agnatha (sea lamprey), Chondrichthyes and Osteichthyes but Teleosts have lost *nanos1A* gene (dotted box). The *nanos1B* synteny was not found in sea lamprey, chimaera (elephant shark), *Xenopus tropicalis* and green anole. The synteny was present but lacked *nanos1B* gene in chicken and human (dotted box). The genomic environments of the two copies of *nanos1* previously described in Teleost fish both corresponded to *nanos1B* synteny. Note that zebrafish *nanos1Ba* synteny has been submitted to chromosomal rearrangements leading to the loss of this gene but the introduction of three successive genes from *nanos1A* synteny. Interestingly, *nanos1A* and *nanos1B* paralogs were both found in chondrichthyan species (ray and sharks) as well as in osteichthyan species at the basis of Sarcopterygii (coelacanth) and Actinopterygii (spotted gar). In addition, *nanos1* syntenies showed common paralogs of *sfxn* and *emx* (*sfxn4* and *emx2* around

nanos1A; *sfxn5* and *emx1* in the vicinity of *nanos1B*), suggesting that both *nanos1A* and *nanos1B* gene copies originate from the duplication of an ancestral chromosomal fragment. Concerning Nanos2 and Nanos3, their genomic environments differ from *nanos1* genes syntenies and from each other. Few genes neighbouring *nanos2* are conserved between basal Actinopterygii (spotted gar) and Sarcopterygii (coelacanth and human) but the syntenic relationship becomes elusive in Teleosts (Supplementary Figure S1). In contrast, the genomic environment of *nanos3* is remarkably conserved from sharks to human and Teleosts (Supplementary Figure S2).

The *nanos1* paralogous genes displayed different evolutionary rates.

A phylogenetic tree was constructed using Nanos protein sequences of representative Vertebrate species including four dogfish *nanos* sequences identified in the present study (Supplementary Figure S3). Nanos1A and Nanos1B paralogous proteins segregated separately as expected. Due to their high inter-species conservation, Nanos1B sequences of Osteichthyes were compressed in this global tree. Another secondary phylogenetic tree was built to further investigate the *nanos1B* paralogs in Teleosts. Nanos1Ba and Nanos1Bb sequences segregated together inside different clades corresponding to Acanthopterygians, Cypriniformes, Salmoniformes and Osteoglossiformes respectively (shaded boxes), supporting the hypothesis that *nanos1Ba* and *nanos1Bb* are ohnologs resulting from the duplication of an ancestral actinopterygian *nanos1B* gene. The Nanos1 paralogous proteins all harbour the two Nanos family CCHC zinc finger motifs at their carboxy terminal conserved end (asterisks, Supplementary Figure S4). For amino acid alignment of Nanos1 sequences, representative Vertebrate species were selected among Chondrichthyes (dogfish, chimaera) and Osteichthyes, including Sarcopterygii (coelacanth, chicken and human) and Actinopterygii (spotted gar, arowana and salmon). Nanos1B proteins show a higher conservation compared to Nanos1A proteins. For example, coelacanth Nanos1A presents only a mean of 7% identity and 16% similarity with the other selected Nanos1A whereas Nanos1B presents respectively 34% identity and 43% similarity with the other selected Nanos1B sequences. In summary, *nanos1A* and *nanos1B* paralogs show different evolutionary

rates after duplication of the ancestral gene but a different gene copy was retained finally in Teleosts (3R-ohnologs *nanos1Ba* and *nanos1Bb*) and in Tetrapods (*nanos1A*).

***nanos1A* and *nanos1B* have different tissue expression patterns in the dogfish.**

The tissue distribution of the two paralogous *nanos1A* and *nanos1B* genes was assessed in male and female *S. canicula* by real-time PCR on a panel of tissues including gills, brain, liver, muscle, fin, heart, spleen, epigonal tissue, eye and sex-specific organs such as shell gland, ovary, epididymis and testis (Figure 3). In all males and a female, *nanos1A* mRNA was detected at a very high level in brain in comparison with other tissues (Figure 3, A and B). In contrast, *nanos1B* showed a relatively ubiquitous expression pattern with an expression that remained significantly higher in the brain of males, but not of females, comparatively to the other tissues, except eyes (Figure 3, C and D). No significant difference of expression of *nanos1A* and *nanos1B* was detected between immature and mature ovaries (Figure 3, B and D). In testicular zones, the expression of *nanos1A* was detected at a relative constant level during spermatogenesis, between the germinative zone (ZA0) and the zones containing cysts with spermatogonia (ZA-), spermatocytes (ZB) and early spermatids (ZC), and was almost undetectable in zone D containing cysts with late spermatids (Figure 4A). Concerning *nanos1B*, a clear progressive decrease of its expression was observed from the germinative zone (ZA0) to zone D (Figure 4B). Our data suggested that *nanos1A* and *nanos1B* might have a distinct expression profile in the testis.

In testis, *nanos1B* mRNA was restricted to spermatogonia contrary to *nanos1A* expressed in germ cells at all stages.

Both *nanos1* transcripts were localized by *in situ* hybridization in testicular germ cells but with different patterns (Figure 5). The transcript of *nanos 1A* showed a broad distribution in germ cells at all stages of differentiation (Figures 5A-5F). It was detected in potential SSCs isolated in a conjunctive tissue (filled arrow, Figure 5B) in the A0 germinative zone, in undifferentiated spermatogonia (open arrow, Figure 5B) in forming cysts and in differentiated spermatogonia (SPG) in cysts composed of one to four

layers of spermatogonia with an adluminal crown of Sertoli cells nuclei (Figures 5C, 5D). This *nanos1A* transcript was also detected in later stages, in zone B in spermatocytes (SPC, Figure 5E), in zone C in round spermatids (rSPT, Figure 5F left panel) but was absent in zone D in elongated spermatids (eSPT, Figure 5F right panel). In contrast, *nanos1B* showed a strong expression restricted to spermatogonia (Figures 5A'-F'). This transcript was detected from potential SSCs (filled arrowheads, Figure 5B') to differentiated spermatogonia (SPG, Figures 5C', D'). This expression was greatly diminished and almost undetectable in cysts containing primary spermatocytes (SPC I, Figure 5E') and undetectable at later stages in germ cells (Figure 5F'). Sense riboprobes gave no signal (Figures 5a, 5a') except in Sertoli cells nuclei of some cysts in zone D using *nanos1B* sense riboprobes suggesting that the signal frequently observed in the nucleus of Sertoli cells in zone D with *nanos1B* antisense riboprobes would also be considered as unspecific (Figure 5F' right panel). So, both *nanos1* transcripts showed a germ cell-specific expression with a broad distribution to all stages of spermatogenesis for *nanos1A* and a spermatogonial-restricted expression pattern for *nanos1B*.

In ovary, both *nanos1* mRNAs were detected in early previtellogenic oocytes and, later, in follicular cells surrounding vitellogenic oocytes.

In female gonads, *nanos1A* and *nanos1B* showed similar expression patterns by *in situ* hybridization. Both transcripts were detected in primary oocytes of primordial follicles (Figures 7A, 7A'). These oocytes are located near the ovary epithelium and are surrounded by some undifferentiated follicular cells which were not labelled (Figures 7A, 7A'). This cytoplasmic expression progressively decreased in oocytes of previtellogenic follicles (Figures 7B, 7B'). In previtellogenic follicles, follicular cells differentiate in two types: granulosa cells adjacent to zona pellucida and theca cells outside the basal lamina. Theca is vascularised and consists in fibroblastic-like inner cells and cuboidal outer cells. In vitellogenic follicles, *nanos1* transcripts were detected in both granulosa and theca cells (Figures 7C, 7C') whereas undifferentiated follicular cells previously showed no signal in primordial follicles (Figures 7A, 7A'). In larger vitellogenic follicles which have multilayered granulosa cells, *nanos* transcripts were

still present in both granulosa and theca cells (Figures 7D, 7D'). As expected, sense riboprobes gave no signal (Figures 7E, 7E'). So, *nanos1A* and *nanos1B* transcripts were both first detected in primary oocytes before vitellogenesis and later, in granulosa and theca cells surrounding vitellogenic oocytes.

Nanos1 proteins showed distinct sub-cellular localizations in dogfish gonads.

To localize Nanos1A and Nanos1B proteins in dogfish gonads, immunohistochemistry was performed on mature testes and ovaries using two primary antibodies (sc-366152 and ab174139) whose specificity was confirmed using Western-blot (Figures 6G, 6G'). In testis of mature male dogfish, Nanos1A protein was detected in the cytoplasm of germ cells at all stages of spermatogenesis (Figures 6A-6E). This strong labelling was localized in the cytoplasm of potential SSCs (filled arrow, Figures 6A, 6F) in the germinal niche (ZAO), in undifferentiated spermatogonia in cysts in formation (open arrow, Figure 6A), in differentiated spermatogonia (SPG, Figures 6B, 6C), in spermatocytes in zone B (SPC, Figure 6D), in round spermatids in zone C (rSPT, Figure 6E left panel) and in cysts with elongated spermatids in zone D (eSPT, Figure 6E right panel). For this last one, labelling was associated to the lumen of the cyst, the middle piece and flagella of spermatids and also to the basal compartment of Sertoli cells (Figure 6E right panel). In contrast, Nanos1B protein showed a restricted expression pattern limited to spermatogonia and primary spermatocytes. Cytoplasmic Nanos1B proteins were detected in most potential SSCs (Figures 6A', 6F'), in some undifferentiated spermatogonia (Figure 6B'), in a lower proportion of differentiated spermatogonia (Figures 6B', 6C') and of primary spermatocytes (Figure 6D'). This cytoplasmic labelling was associated to a nuclear labelling in some SSCs (Figure 6F') and undifferentiated spermatogonia (open arrow, Figure 6A'). In differentiated spermatogonia and primary spermatocytes, a labelling associated to chromosomes was also observed in dividing cells (Figures 6B'-6D'). No signal was detected in spermatids in zones C and D (Figure 6E' left and right panels). In female, Nanos1 proteins were localized in primary oocytes in previtellogenic follicles and in follicular cells at later stages (Figure 8). Primary oocytes presented cytoplasmic and nuclear Nanos1A protein in primordial follicles (Figures 8A, 8a) and previtellogenic follicles (Figures 8B, 8b). The intensity

of the cytoplasmic labelling was decreased according to the growth of the oocyte. In addition, early and more advanced vitellogenic follicles displayed a strong staining in both granulosa and theca cells (Figures 8C, 8c, 8D, 8d). In contrast, Nanos1B protein was detected in oocyte cytoplasm and nucleus of primordial follicles (Figures 8A', 8a') and in oocyte nucleus of previtellogenic follicles (Figures 8B', 8b'). At this stage, labelling in oocyte cytoplasm was extremely weak and no follicular cell was stained. In vitellogenic follicles, Nanos1B expression was confirmed in the cytoplasm of granulosa cells and of outer theca cells but not in the inner theca cells (Figure 8D'). So, Nanos1A and Nanos1B proteins showed cell-type specific distributions in accordance with their respective mRNAs in dogfish gonads, and, interestingly, a different cellular sub-localization since Nanos1B displayed a specific DNA association in early germ cells in male gonad. Our data suggest that Nanos1A and Nanos1B may have distinct functions.

Discussion

In the present study, we first revealed the unexpected presence of two forms of *nanos1* in three Elasmobranch species (small-spotted dogfish, whale shark and little skate), both proteins contained the conserved Nanos family CCHC zinc finger motifs necessary for its function. This result led us to investigate *nanos1* gene copies origin and evolution using two complementary approaches, phylogenetic reconstructions and analyses of syntenic chromosomal fragments. Both *nanos1* paralogs identified in Chondrichthyes were also found in its sister group, the Osteichthyes, in ancient lineages of Actinopterygii (spotted gar) and of Sarcopterygii (coelacanth). In addition, paralogs of two genes of *nanos1A* synteny were localized in the vicinity of *nanos1B* in human and in teleostean fish. In contrast, *nanos1A* was the only *nanos1* gene copy found in an Agnatha genome (sea lamprey). Considering this, we hypothesize that the second round (2R) of whole genome duplication (WGD) that occurred after the divergence of Agnatha from Gnathostomes ancestor (Ohno, 1970; Holland *et al.*, 1994), about 450 million years ago (MYA) (Kumar and Hedges, 1998; Inoue *et al.*, 2010), gave rise to *nanos1B* gene copy. However, in contrast to drosophila *nanos* gene, *nanos1A* and *nanos1B* have no intron and we cannot

exclude that they have emerged through a retroposition event from a cDNA. Synteny analyses showed that Tetrapods have lost the *nanos1B* gene copy. Teleosts underwent a third round (3R) of whole genome duplication about 350 MYA (Christoffels *et al.*, 2004; Jaillon *et al.*, 2004) which gave rise to *nanos1Ba* and *nanos1Bb* ohnologs and to the loss of *nanos1A* gene copy. The loss of gene copies can be explained by the rapid rediploidization process following genome duplication events. Two Teleost specific *nanos1* genes displaying different expression patterns were previously described in Acanthopterygians fish (Aoki *et al.*, 2009). The synteny results support the previous hypothesis of a duplication of *nanos1B* in the ancestor at the base of the teleost radiation. Nanos1B proteins are highly conserved in their C-terminal zinc finger domain, binding targeted RNAs, but also outside this domain. The presence of protein partner interaction sites could explain this high pressure of selection. The particular segregation of Nanos1Ba and Nanos1Bb paralogs in the phylogenetic tree could be due to the high pressures of identical selective forces on both paralogs, inside the different Teleost families, to evolve in parallel and to conserve interactions with the same protein partners (Goh *et al.*, 2000). In comparison, Nanos1A protein sequences showed a much lower conservation at the N-terminal end in Vertebrates. Changes in the protein sequence may have created new opportunities for Nanos1A to acquire new functions in Tetrapods as a single gene copy is available in these species. Another gene involved in germline stemness, *pou5f1* (*oct4*), was shown to result from the duplication of an ancestral *pou2* gene in Vertebrates. The paralogs *pou5f1* and *pou2* were respectively lost in Teleosts and in Mammals, and some Sarcopterygii displayed both copies (Frankenberg and Renfree, 2013).

The tissue expression profiles of the two *nanos1A* and *nanos1B* paralogs described in this study in *Scyliorhinus canicula* are consistent with previous works on these paralogs in Tetrapods and Actinopterygii. Indeed, both paralogs are expressed in the dogfish brain as previously reported for Nanos1 in mouse, sturgeon and medaka (Haraguchi *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2012). However, the role of Nanos1 in brain remains unclear. In *nanos1* deficient mice, no significant neural abnormality was observed and no neural defect in term of behaviour has been identified (Haraguchi

et al., 2003). A multiple tissue distribution was detected for *nanos1B*, an expression pattern also found for this gene copy for both *nanos1a* (*nanos1Ba* in the present study) and *nanos1b* (*nanos1Bb*) in two teleostean fishes, medaka (Aoki *et al.*, 2009) and orange-spotted grouper (Sun *et al.*, 2017). A broad tissue distribution was also observed for Nanos1(B) in a chondrosteian fish (Chinese sturgeon), which emerged after the Chondrichthyes but before the 3R WGD of the Teleosts (Ye *et al.*, 2012).

Concerning *nanos* expression in gonads, most published studies focused on *nanos2* and *nanos3* paralogs which showed highest expression levels in testis in human (Julaton and Pera, 2011) and in testis and in ovary respectively in teleostean fishes (Bellaiche *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017). However, *nanos1* was also revealed to be expressed in gonads in addition to brain in Tetrapods and Actinopterygii. In the shark *S. canicula*, *nanos1A* and *nanos1B* were both detected in ovary and testis. In male gonads, *nanos1* paralogs displayed different expression patterns. Transcripts of *nanos1A* were found in all testicular regions except zone D by real-time PCR. This result was confirmed by *in situ* hybridization with a germinal localization of mRNAs. By immunohistochemistry, Nanos1A protein showed a cytoplasmic distribution in germ cells at all stages. Human and rodents also present a large distribution of NANOS1 protein in germ cell cytoplasm (Jaruzelska *et al.*, 2003) and in nuage structures like the chromatoid body (Ginter-Matuszewska *et al.*, 2011). NANOS1 was also strongly detected in residual bodies of spermatids in rat (Yokota and Onohara, 2013). This could explain the diffuse signal obtained in cysts containing elongated spermatids and during the spermiation process associated to the progressive degeneration of Sertoli cells in the dogfish (Stanley, 1966c). Concerning its potential function, mutations of *nanos1* in human induced a Sertoli-cell-only syndrome resulting from a complete lack of germline cells in the seminiferous tubules (Kusz-Zamelczyk *et al.*, 2013). This observation supports an important role of this gene in germ cell lineage maintenance. In contrast to the large distribution of *nanos1A* in testis, dogfish *nanos1B* was expressed in the germinative zone and in zone A- containing cysts with spermatogonia but rapidly decreased at later stages of spermatogenesis. In accordance with this RT-PCR result, this transcript was strongly detected from the

potential SSCs to differentiated spermatogonia, but was almost undetectable in spermatocytes and was not detected in cysts of spermatids. The different expression patterns of *nanos1* genes in testis could be due to different epigenetic regulations, or to an evolution of the promoter region of *nanos1* gene correlated with different regulatory transcription factors. The stability of the transcripts can also be differentially regulated, for example through specific miRNA. Few descriptions of Nanos1 are available in Actinopterygii. In the primitive chondrosteian fish, *Acipenser sinensis*, Nanos1 was shown to be expressed in germ cell cytoplasm in 4.5 year-old individuals but was not assessed in adult sturgeons (Ye *et al.*, 2012). Surprisingly, the teleostean fish medaka presented an expression of *nanos1(B)a* in somatic cells enclosing spermatocytes and spermatids and no expression of *nanos1(B)b* was observed in testis (Aoki *et al.*, 2009). More studies on its expression and function in the testes of Actinopterygii are needed to understand the evolution of the *nanos1* paralogs in Vertebrates.

In dogfish ovary, *nanos1A* and *nanos1B* transcripts and proteins were both detected in oocytes in primordial follicles. This expression progressively decreased during oocyte growth in previtellogenic oocytes and was no more detectable in vitellogenic oocytes. Granulosa cells and outer theca cells surrounding vitellogenic oocytes expressed *nanos1* paralogs contrary to follicular cells at earlier stages. Nanos1 proteins were detected in the cytoplasm but also in the nucleus of primary oocytes, particularly strongly at previtellogenic stage. Contrasting results were reported concerning *nanos1* expression in the ovary depending on the species. *Nanos1* was not detected in ovary in human (Jaruzelska *et al.*, 2003) like *nanos1b* in medaka (Aoki *et al.*, 2009). Oocytes but not follicular cells were shown to present *Nanos1* expression in juvenile sturgeon (Ye *et al.*, 2012), in mouse (by LacZ reporter system under *Nanos1* promoter region (Haraguchi *et al.*, 2003)), and in *Xenopus*. More precisely, *Nanos1* mRNA (*Xcat2*) was concentrated in germ plasm components of early staged oocytes in frog without translation before fertilization (Kloc *et al.*, 1996; Zhou and King, 1996; Macarthur *et al.*, 1999). In contrast, *nanos1a* was localized in somatic cells surrounding oocytes in female medaka at 10 days post-hatching but was undetectable in adult ovary (Aoki *et al.*, 2009). Interestingly, *Vasa*, another maternal

factor specifically expressed in germ cells, was described in germline cells but also in somatic cells in the ovary of adult drosophila and lizard. This protein was indeed localised in the nurse cells throughout early stages of oogenesis in drosophila (Lasko and Ashburner, 1990). In the lizard, Vasa protein was detected in intermediate and pyriform follicular cells surrounding the oocyte in immature follicles (Maurizii *et al.*, 2009). In both species, Vasa protein is transferred to the oocyte cytoplasm at later stages of oogenesis. In summary, no consensual expression pattern could be determined for *nanos1* in the ovary of Vertebrates but both the oocyte and follicular cell expressions found in dogfish were already reported in other species and we cannot exclude the transfer of proteins between somatic and germinal cells as it was described for Vasa protein.

Nanos1B was detected in the nucleus of potential SSCs and co-localized with chromosomes during mitosis of spermatogonia and meiosis of primary spermatocytes in dogfish testis and in the nucleus of early primary oocytes in ovary. A co-localization of a Nanos protein with chromosomes during mitosis and meiosis has been previously reported in adult human germ cells for NANOS3 but not for NANOS1 (Julaton and Pera, 2011). NANOS3 protein showed the highest expression in the nucleus of oocytes in primordial follicles and in oocyte cytoplasm until antral follicles in human ovary and was detected in the nucleus of male germ cells and co-localized with chromosomes during cellular division in testis. In addition, during foetal life, NANOS1 was detected in gonocyte nuclei while during post-natal life, it was distributed in nucleus and in perinuclear cytoplasm in human and marmoset gonocytes (Mitchell *et al.*, 2008). This raises the question of the evolution of the functions of these proteins and their potential role during mitosis/meiosis.

Nanos was shown to play a crucial role in the maintenance of germline stem cells, through the suppression of meiosis in fly (Kobayashi *et al.*, 1996), nematode (Subramaniam and Seydoux, 1999), mice (Tsuda *et al.*, 2003) and zebrafish (Beer and Draper, 2013b). More precisely, the conserved carboxy terminal region of this RNA-binding protein binds the 3' untranslated region of mRNAs to

repress their translation (Curtis *et al.*, 1997), in association with other proteins such as Pumilio (for review, (Lai and King, 2013)). However, in Vertebrates, the different paralogs of *nanos* play distinct roles in germ cell fate but also functional redundancy. For instance, *Nanos3*-null female are infertile but *Nanos2* expression in these females rescues their defects (Suzuki *et al.*, 2007). Our study supports a role of *Nanos1A* and *Nanos1B* in dogfish male and female germ cells. Although their expression patterns were similar in the ovary, they showed a partial overlapping distribution in the testis, suggesting a possible redundancy but also most probably distinct roles for these two *Nanos1* paralogs.

To conclude, this study sheds light on the origin and the evolutionary history of two distinct *nanos1* paralogs in Vertebrates. Our observations revealed a hidden paralogy resulting from an ancient duplication of the *nanos1* gene at the basis of Vertebrates and different gene copies losses between Tetrapods and Teleosts. Both gene copies showed different evolutionary scenarios since, in contrast to *nanos1A*, *nanos1B* was maintained and duplicated in the Teleosts and the amino acids sequence was highly conserved for hundred million years in fish species only. In dogfish, a basal Gnathostome, we demonstrated that *nanos1A* and *nanos1B* showed different expression patterns in gonads consistent with possible distinct roles in germ cell fate regulation. However, further investigations will be required to understand the biological significance of the coexistence of four *nanos* paralogs (*nanos1A*, *nanos1B*, *nanos2*, *nanos3*) in basal Vertebrates.

Materials and methods

Phylogenetic and synteny analyses

Nanos sequences were selected using the TBLASTN algorithm and mouse NANOS protein sequences as queries to identify homologous sequences in ESTs, mRNAs and genome databases deposited at the NCBI or EMBL institutes. Dogfish *nanos1* transcripts were found in a library built from embryos, juveniles and adult tissues (Redon *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2013) and in dogfish gonadal transcripts libraries generated by Illumina (Phylofish ANR funded project coordinated by J. Bobe and Y. Guiguen,

Fish Physiology and Genomics unit, Rennes, France). In addition, dogfish *nanos* genes were identified and localized in dogfish genome (GenoShark project). Dogfish *nanos* sequences were submitted to Genbank. Sequences accession numbers are detailed in Supplementary Table S5. Nanos protein sequences were aligned using BioEdit ClustalW multiple alignment editor software version 7.1.3.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) and phylogenetic trees were built using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Trees were constructed using the Neighbour-Joining method and the reliability of the inferred trees was assessed using the bootstrap procedure with 1000 replications.

Nanos1 protein sequences representative for Sarcopterygii (coelacanth, chicken and human), Actinopterygii (spotted gar, arowana and salmon) and Chondrichthyes (dogfish and chimera) were aligned using BioEdit software. Conserved Cys-Cys-His-Cys zinc finger motifs, essential for Nanos function, were annotated (Curtis *et al.*, 1997).

The *nanos* genes were mapped on the genome of different vertebrate species using NCBI or Ensembl genome browsers. Neighbouring genes that were not annotated were determined using the amino acid sequence of heterologous counterparts as query sequence. The annotation of the newly detected genes was validated using reciprocal blast queries.

Animals

Adult male and female dogfish *Scyliorhinus canicula* were captured from the English Channel using the facilities of the Lycée Maritime et Aquacole (Cherbourg, France). The aquarium La Cité de la Mer (Cherbourg) first stored them in natural seawater tanks waiting their transfer to the Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC, Luc sur Mer, France). The CREC facilities were approved by the direction of the Council Department of populations care (Direction départementale de la protection des populations du Calvados, préfecture du Calvados) under number A14384001. No

specific permits were required for these field studies and procedures were performed according to the European directive 2010/63/UE for care and use of animals. The dogfish *S. canicula* is not an endangered or protected species according to the *International Union for Conservation of Nature*. Sharks were allowed to acclimate for at least 2 weeks before tissue sampling and were euthanized by percussive blow to the head followed by sectioning of the spinal cord and pithing (except when brain was collected). All efforts were made to minimize suffering. The personnel were trained and qualified for animal experimentation. Testes were sampled and transferred directly into Gautron buffer (Loir and Sourdaire, 1994b) complemented by 58 mM trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) and cut transversally into 2-mm slices fresh testicular sections. These sections were then dissected under a stereomicroscope into five zones (A0, A-, B, C, and D) based on their transillumination appearance as described previously (Loir and Sourdaire, 1994b). All tissues were frozen in liquid nitrogen for RNA extraction or fixed 24h by 4% paraformaldehyde (w/v in PBS) for immunohistochemistry and *in situ* hybridization.

RNA extraction and purification

In RNase-free conditions, each frozen sample was grounded in 1ml TRI-Reagent® by Ultra-Turrax® (IKA®T10 basic, Staufen, Germany). Total mRNA was extracted by complementation of 200 µl chloroform, homogenized and centrifuged for 15 min at 4°C at 12 000 *rpm*. Aqueous phases were transferred into new tubes with 500 µl isopropanol (1:1, v/v), centrifuged, and pellets were rinsed twice with 75% ethanol and 100% ethanol (v/v) and air-dried at RT. Total RNAs were re-suspended in DEPC-treated water and quantified with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Les Ulis Courtaboeuf, France).

Reverse Transcription (RT)

To prevent any DNA contamination, 0.5 µg of total RNA was treated with 3 U RQ1 DNase (Promega, Madison, USA) in a 10 µl volume and incubated for 30min at 37°C. To stop the enzyme reaction 1 µl of

Stop solution was added followed by 10min heating at 65°C. One µg random hexamers was added and total RNA was denatured for 5 min at 70°C. The RT was immediately carried out for 1 h at 37 °C with 500 nM dNTP, 24 U RNasin, 200 U M-MLV-RT in 1x M-MLV RT buffer (Promega) in a 25 µl final volume.

Real-time PCR

Real-time PCR was performed on an iCycler iQ apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA) in duplicate and repeated using cDNA from three different animals for male and female. Panels of tissues included gills, brain, liver, muscle, fin, heart, spleen, epigonal tissue and eye. It was completed with shell gland, immature ovaries (containing previtellogenic oocytes) from sub-adult females and mature ovaries (containing also vitellogenic oocytes) from adult females, and epididymis and the testicular A0 zone, corresponding to the germinative area, in males. In addition, cDNA from four animals were used to compare mRNAs expression in the five testicular zones (A0, A-, B, C and D). RT-PCR primers were designed on *Nanos1a* and *Nanos1b* divergent parts of the nucleic sequence (Supplementary Table S6). Real-time PCR mix is composed 0.3 µM of each primer and 1x GoTaq® qPCR Master mix (Promega) in nuclease free water. In each well, 5 µl of 1:20 (for mRNA expression) and 1:2000 (for 5S rRNA normalization) diluted cDNA was added to the 20µl of qPCR mix. The PCR cycle parameters were as followed: 1× (95 °C, 2min); 45×[(95 °C, 30 s) and (60 °C, 45 s)]; and 80×(55+0.5 °C, 10 s). Results were established with the iCycler Software (IQTH 3.1 Bio-Rad). For each plate, efficiency of PCR was assessed using appropriate dilution series, and single amplicon formation was confirmed on melting curves or validated by electrophoresis migration. The relative expression levels of *nanos1A* and *nanos1B* were normalized with the 5S rRNA (Redon *et al.*, 2010). Significant statistical groups (a, b, c, and d) were created using confidence intervals, each different group differed with a p-value inferior to 0.05%, and relative expression results were shown by mean± standard deviation (SD).

***In situ* Hybridization (ISH)**

Dig-conjugated riboprobes were synthesized from cDNA clones constructed in the pSPORT1 vector. Complementary DNAs were amplified through a standard PCR procedure with M13 forward and reverse primers (Supplementary Table S6). *In vitro* transcription was carried out on 1µg purified PCR product using the DIG RNA labelling kit and in accordance to the manufacturer instructions (Roche, Mannheim, Germany). Riboprobes were purified by precipitation, ethanol washed and quantified using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Washington, Delaware USA). The cDNA clones were built using the Superscript plasmid system with Gateway technology (Invitrogen), so that T7 and Sp6 enzymes produced respectively antisense and sense riboprobes.

Testicular cross sections, 0.5 cm-thick, and ovary samples were fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde (w/v in PBS) for 24 h and progressively dehydrated in a series of PBS/ethanol solutions. Testis samples were incubated in butanol overnight and embedded in paraffin to be stored at 4°C before use. Five µm-thick cross sections were cut with a microtome and mounted on Superfrost slides. Sections were deparaffinized by two bathes of Roti®-Histol, and rehydrated with ethanol bathes at decreasing concentrations (100%, 96% and 70% in DEPC water) and one PBS bath. Sections were then fixed in 4% PFA for 10min, rinsed in PBS and permeabilized with 5 µg/ml proteinase K (Roche, Mannheim, Germany) in 0.05 M Tris and 0.01 M EDTA, pH 8. After two PBS washes, sections were refixed in 4% PFA for 10min and washed with PBS. Sections were put in NaCl 150mM for 5min and then incubated for 1h in prehybridization mix (deionised formamide 50% (v/v), 2X SSC, 5mM EDTA pH8, 0.1% Tween 20, 1X Denhardt's solution, 169 µM heparin, 0.1% CHAPS, 50 µg/ml tRNA) at 65°C in a humid chamber. Hybridization was performed overnight in prehybridization mix containing 4ng/µl riboprobes. Sections were rinsed in SSC 1X and SSC 1.5X for 10min at 65°C and incubated in SSC 2X for 20min twice at 37°C. RNase A treatment (0.2µg/ml in SSC 2X) was then performed for 30min at 37°C followed by one bath of SSC 2X at RT and 2 bathes of 30min in SSC 0.2X at 57°C. Sections were then incubated in 1x MABT (0.1 M maleic acid, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20 in DEPC-treated water, pH 7.5) for 15min twice and in a blocking solution (5% decomplexed sheep serum in 1x MABT) for 3h at RT. Immunodetection was performed with an anti-DIG antibody coupled with alkaline phosphatase

(1:2000 dilution, Roche, Mannheim, Germany) in blocking solution overnight at 4°C. Several MABT 1X washes from 5 to 30min were performed and pre-revelation treatment was done by 2X 15min NTMT solution (100 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, and 0.1% Tween 20 in DEPC-treated water). Finally, staining was revealed by the addition of 61 µM NBT/57 µM BCIP (Roche, Mannheim, Germany) in NTMT solution until staining could be visually detected. Sections were mounted with Vectashield mounting medium. Images were acquired using a Nikon eclipse 80i microscope equipped with Nikon NIS-Elements D 3.0 Software (Nikon Instruments, Japan). Testicular sections were described according previously determined cysts stages (Loir *et al.*, 1995). Ovary sections were characterised based on histological studies in rays (Prisco *et al.*, 2003; Wehitt *et al.*, 2015).

Immunohistochemistry

Dogfish testis and ovaries cross sections were cut from paraffin blocks and placed on polysine-coated slides. These 3-µm sections were deparaffinized in Roti[®]-Histol baths and rehydrated by a series of ethanol dilutions. Antigen unmasking was performed by a microwaves heating followed by a cooling for 1 h at room temperature (RT). Endogenous peroxidase activity was blocked by a bath of 30 min in 3% hydrogen peroxide /PBS, and the saturation of unspecific sites was performed by a 30 min incubation in 1% BSA (w/v) /triton 0.1% (v/v) /phosphate-buffered saline (PBS). Heterologous primary antibodies were used; a rabbit polyclonal primary antibody (1:50 dilution, sc-366152, Santa Cruz Biotechnology) produced against the conserved C-terminal sequence (amino-acids 205-250) of human Nanos1, closer to dogfish Nanos1A. The second rabbit polyclonal antibody used (1:50 dilution, ab174139, Abcam) was directed against the internal sequence (amino-acids 57-85) of human Nanos2, a peptide closer to Nanos1B as determined by blast against dogfish cDNA banks. Both were diluted in blocking solution and incubated overnight at 4°C. Sections were rinsed and incubated for 2h at RT with the secondary swine polyclonal antibody anti-rabbit immunoglobulins conjugated to HRP (1:200 dilution, PO399, Dako, Glostrup, Denmark). The revelation was performed by diaminobenzidine (DAB). After washes and counterstaining for 1 min in hematoxylin, sections were dehydrated and mounted in

Roti-Histokit medium. Images were made using a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with NIS-Elements D 3.0 software (Nikon Instruments, Japan).

Western Blot

Proteins were extracted from male dogfish brain. Fresh tissue was homogenized on ice using conical pestles in 1 ml of lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5; 1 mM EDTA; 0.5 mM DTT) and anti-protease mixture (1 mM AEBSF, 10 μ M E64). Sample was sonicated three times for 5 s each with a pause of 30 s between each pulse and then centrifuged for 30 min at 14 000 *rpm* at 4°C. Proteins (100 μ g) from the supernatant were separated in 15% SDS PAGE gel and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. After a blocking step of 1 h in PBS/3% BSA at room temperature, membranes were incubated overnight in the previously used primary antibodies diluted in blocking buffer (1:200). After five washes of 5 min each, membranes were incubated for 1 h 30 min at RT with the secondary swine polyclonal anti-rabbit IgG HRP-conjugated antibody (1:1000 dilution, P0399, DAKO). After washes, peroxidase reaction was developed with DAB solution (D4293; Sigma).

Data Availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

Acknowledgements

This research was supported by the “Conseil Régional de Basse-Normandie” and “Fonds Européen de Développement Régional” (PEPTISAN project certified by the competitiveness cluster “Pole Mer Bretagne”). Laura Gribouval PhD studies are supported by ANRT and Kelia (CIFRE grant). The authors are grateful to Mr Faliguerho and Mr Lequenne of the “Lycée Maritime et Aquacole de Cherbourg” (France) for capturing the dogfish specimens, the aquarium “La Cité de la mer” staff and particularly Mr Faure, Mr Bouis and Mr Cauvin (Cherbourg, France) and Mr Guyon of the “Centre de Recherches

en Environnement Côtier” (Luc sur mer, France) for the care given to the dogfish. The authors also thank Ms Adeline for her useful advices in histology and Dr Jérémy Pasquier for enriching discussions concerning phylogeny and synteny analyses. The authors thank warmly Dr Sylvie Dufour for proofreading and precious advices.

Author contributions

L.G. participated in the design of the study, conducted the experiments, analysed the results and drafted the manuscript. P.S. participated in the design of the study, data analysis and manuscript writing. J.J.L. performed *in silico* analyses, participated in the design of the study, data analysis and manuscript writing. J.B. participated to *in silico* analyses and data analysis. F.L.G. participated in the design of the study and data analysis. S.M. generated transcriptomic and genomic data in dogfish and participated in data analysis. C.G. and P.A. participated to proofreading. A.G. conceived the study, performed *in silico* analyses, participated in data analysis and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Additional information

Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

1. Arrizabalaga, G. & Lehmann, R. A selective screen reveals discrete functional domains in *Drosophila* Nanos. *Genetics* **153**, 1825–1838 (1999).
2. Curtis, D. *et al.* A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. *EMBO J.* **16**, 834–843 (1997).
3. Hashimoto, H. *et al.* Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional

- implications. *EMBO Rep.* **11**, 848–853 (2010).
4. Suzuki, A. & Saga, Y. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev.* **22**, 430–435 (2008).
 5. Lehmann, R. & Nusslein-volhard, C. The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the Drosophila embryo. *Development* **112**, 679–691 (1991).
 6. Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M. & Kitamura, T. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in Drosophila. *Nature* **380**, 708–710 (1996).
 7. Lai, F., Singh, A. & King, M. Lou. Xenopus Nanos1 is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells. *Development* **139**, 1476–1486 (2012).
 8. Kopranner, M., Thisse, C., Thisse, B. & Raz, E. A zebrafish nanos -related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* **15**, 2877–2885 (2001).
 9. Tsuda, M. *et al.* Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science* (80-). **301**, 1239–1241 (2003).
 10. Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H. & Saga, Y. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science* **325**, 1394–8 (2009).
 11. Aoki, Y. *et al.* Expression and Syntenic Analyses of Four nanos Genes in Medaka Expression and Syntenic Analyses of Four nanos Genes in Medaka. *Zoolog. Sci.* **26**, 112–118 (2009).
 12. Bellaïche, J. *et al.* Spermatogonial Stem Cell Quest : nanos2 , Marker of a Subpopulation of Undifferentiated A Spermatogonia in Trout Testis 1. *Biol. Reprod.* **90**, 1–14 (2014).
 13. Haraguchi, S., Tsuda, M., Kitajima, S. & Sasaoka, Y. nanos1 : a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech. Dev.* **120**, 721–731 (2003).
 14. Kusz-Zamelczyk, K. *et al.* Mutations of NANOS1 , a human homologue of the Drosophila morphogen , are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-asthenoteratozoospermia. *J. Med. Genet.* **50**, 187–193 (2013).
 15. Kusz, K. M. *et al.* The highly conserved NANOS2 protein : testis-specific expression and

- significance for the human male reproduction. *Mol. Hum. Reprod.* **15**, 165–171 (2009).
16. Kusz, K. *et al.* NANOS3 Gene Mutations in Men With Isolated Sterility Phenotype. *Mol. Reprod. Dev.* **76**, 804 (2009).
 17. Venkatesh, B. *et al.* Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* **505**, 174–9 (2014).
 18. Read, T. D., Petit III, R. A. & Joseph, S. J. Draft sequencing and assembly of the genome of the world's largest fish, the whale shark: *Rhincodon typus* Smith 1828. *PeerJ Prepr.* 1–21 (2015).
 19. Wang, Q. *et al.* Original article Community annotation and bioinformatics workforce development in concert — Little Skate Genome Annotation Workshops and Jamborees. *Database* **2012**, 1–11 (2012).
 20. Wyffels, J. *et al.* SkateBase , an elasmobranch genome project and collection of molecular resources for chondrichthyan fishes [v1 ; ref status : indexed , <http://f1000r.es/445>] Referee Status : *F1000Research* (2015). doi:10.12688/f1000research.4996.1
 21. Redon, E. *et al.* Stage-specific gene expression during spermatogenesis in the gogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Reproduction* **140**, 57–71 (2010).
 22. Quan, F. B., Kenigfest, N. B., Mazan, S. & Tostivint, H. General and Comparative Endocrinology Molecular cloning of the cDNAs encoding three somatostatin variants in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **180**, 1–6 (2013).
 23. Dulvy, N. K. *et al.* Extinction risk and conservation of the world ' s sharks and rays. *Elife* 1–34 (2014). doi:10.7554/eLife.00590
 24. Loir, M. & Sourdain, P. Testis cells: isolation and culture. *Biochem. Mol. Biol. Fishes* **3**, 249–272 (1994).
 25. Loppion, G., Crespel, A., Martinez, A.-S., Auvray, P. & Sourdain, P. Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus canicula* L. *Cell Tissue Res.* **332**, 533–42 (2008).
 26. Bosseboeuf, A., Gautier, A., Auvray, P., Mazan, S. & Sourdain, P. Characterization of

- spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.).
Reproduction **147**, 125–39 (2014).
27. Holland, P. W., Garcia-Fernández, J., Williams, N. A. & Sidow, A. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev. Suppl.* **1994**, 125–133 (1994).
 28. Ohno, S. *Evolution by Gene Duplication*. (Springer Berlin Heidelberg, 1970). doi:10.1007/978-3-642-86659-3
 29. Kumar, S. & Hedges, S. B. Vertebrate Evolution. 917–920 (1998).
 30. Inoue, J. G. *et al.* Evolutionary Origin and Phylogeny of the Modern Holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes): A mitogenomic perspective. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 2576–2586 (2010).
 31. Jaillon, O. *et al.* Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**, 946–957 (2004).
 32. Christoffels, A. *et al.* Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1146–1151 (2004).
 33. Goh, C.-S., Bogan, A. A., Joachimiak, M., Walther, D. & Cohen, F. E. Co-evolution of proteins with their interaction partners. *J. Mol. Biol.* **299**, 283–293 (2000).
 34. Frankenberg, S. & Renfree, M. B. On the origin of POU5F1. *BMC Biol.* **11**, 56 (2013).
 35. Ye, H. *et al.* Molecular and expression characterization of a nanos1 homologue in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Gene* **511**, 285–292 (2012).
 36. Sun, Z. *et al.* Divergent Expression Patterns and Function Implications of Four nanos Genes in a Hermaphroditic Fish , *Epinephelus coioides*. *Int. J. Mol. Sci.* (2017).
doi:10.3390/ijms18040685
 37. Julaton, V. T. A. & Pera, R. A. R. NANOS3 function in human germ cell development. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2238–2250 (2011).
 38. Jaruzelska, J. *et al.* Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. *Dev. Genes Evol.* **213**, 120–126 (2003).

39. Ginter-matuszewska, B. *et al.* NANOS1 and PUMILIO2 bind microRNA biogenesis factor GEMIN3 , within chromatoid body in human germ cells. *Histochem. Cell Biol.* **136**, 279–287 (2011).
40. Yokota, S. & Onohara, Y. Expression and Localization of NANOS1 in Spermatogenic Cells during Spermatogenesis in Rat. *CellBio* **2**, 1–10 (2013).
41. Stanley, H. P. Seminiferous follicle in *S caniculus* and *T marmorata*. **8**, (1966).
42. Kloc, M., Larabell, C. & Etkin, L. D. Elaboration of the Messenger Transport Organizer Pathway for Localization of RNA to the Vegetal Cortex of *Xenopus* Oocytes. *Dev. Biol.* **180**, 119–130 (1996).
43. Zhou, Y. & King, M. Lou. Localization of Xcat-2 RNA , a putative germ plasm component , to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* **122**, 2947–2953 (1996).
44. Macarthur, H., Bubunenko, M., Houston, D. W. & King, M. Lou. Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **84**, 75–88 (1999).
45. Lasko, P. F. & Ashburner, M. Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev.* **4**, 905–921 (1990).
46. Maurizii, M. G. *et al.* Vasa protein is localized in the germ cells and in the oocyte-associated pyriform follicle cells during early oogenesis in the lizard *Podarcis sicula*. *Dev. Genes Evol.* **219**, 361–367 (2009).
47. Mitchell, R. T. *et al.* Germ cell differentiation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human. *Hum. Reprod.* **23**, 2755–65 (2008).
48. Subramaniam, K. & Seydoux, G. nos-1 and nos-2 , two genes related to *Drosophila nanos* , regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **126**, 4861–4871 (1999).
49. Beer, R. L. & Draper, B. W. Nanos3 Maintains Germline Stem Cells and Expression of the Conserved Germline Stem Cell Gene Nanos2 in the Zebrafish Ovary. *Dev. Biol.* **374**, 308–18 (2013).

50. Lai, F. & King, M. Lou. Repressive Translational Control in Germ Cells. *Mol. Reprod. Dev.* **676**, 665–676 (2013).
51. Suzuki, A., Tsuda, M. & Saga, Y. Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. *Development* **134**, 77–83 (2007).
52. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, msw054 (2016).
53. Redon, E. *et al.* Stage-specific gene expression during spermatogenesis in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Reproduction* **140**, 57–71 (2010).
54. Loir, M., Sourdain, P., Mendis-Handagama, S. M. L. C. & Jégou, B. Cell-Cell Interactions in the Testis of Teleosts and Elasmobranchs. *Microsc. Res. Tech.* **32**, 533–552 (1995).
55. Prisco, M. *et al.* Apoptosis during spermatogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol. Reprod. Dev.* **64**, 341–8 (2003).
56. Wehitt, A., Di Giacomo, E. E. & Galíndez, E. J. The Female Reproductive System of *Zearaja chilensis* (Guichenot, 1848) (Chondrichthyes, Rajidae): Gametogenesis and Microscopic Validation of Maturity Criteria. *Int. J. Morphol.* **33**, 309–317 (2015).

Figure legends

Figure 1: Gene synteny comparisons provide evidences that multiple *nanos1* gene duplications and losses occurred in vertebrates

Three *nanos1* paralogs and their neighbouring genes showed syntenic genomic locations through Vertebrates. In the top panel, genes in the vicinity of a first copy, named *nanos1A*, were mapped. The figure was not drawn to scale. Each gene was represented by a specific coloured box. The name of each scaffold or chromosome harbouring the synteny is indicated at the top for each species whereas *nanos1* gene copy and protein accession numbers are detailed at the bottom. Although the structure of the chromosomal fragment was well conserved during the evolution, the *nanos1A* gene copy is not observed in the genome of Teleost fish as symbolized by the dotted boxes. In the bottom panel, the genomic environment of the second *nanos1* gene copy, termed *nanos1B*, was similarly represented. This different syntenic chromosomal fragment was not found in lamprey suggesting its apparition in Gnathostomata. Both *nanos1* paralogs (*nanos1A* and *nanos1B*) were detected in Chondrichthyes (dogfish and whale shark) and in Osteichthyes, respectively at the basis of Sarcopterygii (coelacanth) and of Actinopterygii (spotted gar). In contrast, *nanos1B* gene was not found in elephant shark, xenopus, green anole, chicken and human, suggesting its loss in these species. Teleosts showed two *nanos1B* gene copies carried by similar but distinct chromosomal fragments. The two *nanos1* paralogs in Teleosts were re-named *nanos1Ba* and *nanos1Bb*. Note that zebrafish is an atypical fish species because its genome does not harbour the *nanos1Ba* gene copy as indicated by a spotted box.

Figure 2: Hypothetical model of *nanos1* gene duplications and copy losses during Vertebrate evolution.

Based on *nanos1* synteny and phylogenetic trees, two rounds of duplication of the ancestral lamprey *nanos1* gene were observed. At the basis of Vertebrates, the sea lamprey displays only the ancestral *nanos1A* gene copy. The first gene duplication giving rise to the *nanos1B* paralog may have occurred

following the second genome duplication (2R) at the basis of Gnathostomata (box 1B). Chondrichthyan species (shark and ray) have kept both gene copies except the Holocephali (chimaera). In Osteichthyes, both paralogs were found in basal Sarcopterygii (coelacanth) but *nanos1B* was lost by Tetrapoda (crossed box 1B). Both *nanos1A* and *nanos1B* paralogs were found in basal Actinopterygii (spotted gar) but *nanos1A* was lost in Teleostei (crossed box 1A). Coinciding with the third round of whole genome duplication (3R), *nanos1B* gene copy would have undergone a second duplication in a Teleost ancestor giving rise to *nanos1Ba* and *nanos1Bb* gene copies (box 1B^{a/b}). The *nanos1* paralogs present in the different species are summarized on the right.

Figure 3: *nanos1A* and *nanos1B* transcripts show distinct tissue distributions in male and female *S. canicula*

Messenger RNA relative abundances of *nanos1A* (A-B) and *nanos1B* (C-D) were quantified in panels of tissues in male (A, C) and female (B, D) dogfish by real-time PCR. Data were normalized using *5S rRNA*. In both sexes, *nanos1A* showed a preferential expression in brain (A-B) whereas *nanos1B* showed a relatively ubiquitous expression pattern (C-D). Mature ovaries sampled from adult females and containing vitellogenic oocytes showed no significant difference of expression levels compared to immature ovaries sampled from pre-adult females and containing previtellogenic oocytes only (B, D). Statistical analyses were performed using confidence intervals. The different statistical groups are represented by a, b and c letters, p-value between different statistical groups inferior to 0.05%. Values represent means \pm SD of three dogfishes (N=3).

Figure 4: Specific expression patterns of *nanos1A* and *nanos1B* in dogfish testicular zones.

The relative abundance of *nanos1A* and *nanos1B* mRNAs in the five testicular zones was measured by RT-PCR and normalized with *5S rRNA*. Dogfish polarized testis was dissected in five zones from its dorsal to its ventral side: ZA0, germinative zone containing SSCs; ZA-, cysts with spermatogonia; ZB, meiotic zone; ZC, cysts with round-spermatids; and ZD, cysts with elongated spermatids and zone of

cyst resorption. The *nanos1A* transcript was detected in all zones except in zone D where it was almost undetectable. In contrast, *nanos1B* showed a marked progressive decrease of its expression after the germinative zone, ZAO. Statistical analysis was performed using confidence interval. a, b and c represent each statistical different group, p-value inferior to 0.05%. Values represent means \pm SD of 4 dogfish in duplicate (N=4).

Figure 5: Different but both germ cell-specific expressions of *nanos1A* and *nanos1B* in dogfish testis.

The cellular distribution of *nanos1* mRNAs was evaluated by *in situ* hybridization on dogfish testicular sections with antisense digoxigenin-conjugated riboprobes directed against *nanos1A* (A-F) or *nanos1B* transcripts (A'-F'). a and a' represent sense riboprobes ISH for *nanos1A* and *nanos1B* respectively. The *nanos1A* transcripts were detected in the potential SSC (filled arrow) and in undifferentiated spermatogonia (open arrow) of the zone A0 (B), in the spermatogonia (SPG) of zone A- (C-D) as well as in the primary spermatocytes (SPCI) of the zone B (E) and in the round spermatids (rSPT) of the zone C (F left panel). No signal was observed in the elongated spermatids (eSPT) of the zone D (F right panel) nor in the Sertoli cells (their nuclei are indicated by SN). The *nanos1B* transcripts were mainly detected in the potential SSC (filled arrow), the undifferentiated spermatogonia (open arrow) of zone A0 (B') and in spermatogonia (SPG) of zone A- (C'-D'). A marked decrease in *nanos1B* expression was observed in the primary spermatocytes (SPCI) of zone B (E') and no transcript was present in the germ cells of zone C (F' left panel) and zone D (F' right panel). Aspecific labelling was observed in Sertoli cells nuclei of zone D using *nanos1B* riboprobes (F' right panel). L: lumen of the cyst; A, A': overview of zone A of testis.

Figure 6: Different subcellular localizations of Nanos1A and Nanos1B proteins in dogfish testis.

Immunohistochemistry has been performed on testis paraffin sections to detect Nanos1A (A-F) and Nanos1B (A'-F'). 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) has been used for the revelation. A''- E'' represent the

negative control. The Nanos1A protein was detected in potential SSC (A filled arrow) and in undifferentiated spermatogonia (open arrow) leaving zone A0 (A). In these cells, Nanos1A localized in the cytoplasm (F filled arrowhead) and in the nucleus (F open arrowhead). The protein was also detectable during the different stages of spermatogenesis but only in germ cell cytoplasm as observed in zone A (B and C) in spermatogonia (SPG), in zone B (D) in spermatocytes (SPC), in zone C (E left panel) in round spermatids (rSPT) and finally in zone D (E right panel) in elongated spermatids (eSPT). In contrast, Nanos1B was expressed in potential SSCs (filled arrow, A'), undifferentiated spermatogonia (open arrow, A') leaving the germinal niche and a fraction of differentiated spermatogonia (B', C') and spermatocytes (D' right panel). No expression was detected in zones C (E left panel) and D (E right panel). Specific nucleus expression was noticed in some potential SSCs (F' open arrowhead) and a specific DNA labelling was detected in spermatogonia and spermatocytes in division (A'-D'). The specificity of the antibodies used was validated by Western-blot analysis (G, G'). Male brain protein extract was used as *nanos1* expression was the highest in this tissue. Proteins migrated in 15% SDS PAGE gels to separate low molecular weights since Nanos2 and Nanos3 theoretical molecular weights were estimated at 17.4 and 22.8 kDa respectively. Single bands were detected around the expected molecular weights, respectively 27.1 and 25 kDa for Nanos1A and Nanos1B.

Figure 7: Similar distribution of *nanos1A* and *nanos1B* transcripts in germ cells and in follicular cells in dogfish ovary.

The localization of *nanos1* mRNAs was determined in ovaries *by in situ* hybridization using antisense digoxigenin-conjugated riboprobes directed against *nanos1A* (A-D) or *nanos1B* transcripts (A'-D'). E and E' represent results obtained with sense riboprobes for *nanos1A* and *nanos1B* respectively. The *nanos1A* transcripts were detected in primary oocyte of primordial follicles (around 100 μm in \emptyset illustrated in A). This labelling progressively decreased during oocyte growth until being undetectable in previtellogenic follicles (around 300 μm in \emptyset illustrated in B). The mRNAs were also detected in the granulosa cells (GC) and the outer theca cells (oTC) of early (C) and the more advanced (D) vitellogenic

follicles (around 500 μm and >2 mm in \emptyset respectively). The same expression profile was detected for *nanos1B* with an expression in primary oocyte of primordial follicles (A'), in granulosa (GC) and outer theca cells (oTC) of early (C) and more advanced (D) vitellogenic follicles. In previtellogenic follicle (B'), *nanos1B* was still detectable in oocyte cytoplasm. b: blood cells, BL: basal lamina, GC: granulosa cells, N: nucleus, n: nucleolus, Oo: primary oocyte, TC: theca cells, iTC: inner theca cells, oTC: outer theca cells, Y: yolk, ZP: zona pellucida.

Figure 8: Nanos1A and Nanos1B proteins share a similar expression profile in dogfish ovary.

Immunohistochemistry has been performed on dogfish ovaries paraffin sections to detect Nanos1A (A-D, higher magnification in a-d) and Nanos1B (A'-D', higher magnification in a'-d'). 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) was used for the revelation. E and E' illustrate the negative control. The Nanos1A protein was detected in primary oocytes from primordial follicles (around 100 μm in diameter, A, a) to early vitellogenic follicles (around 500 μm in \emptyset , C, c) in the cytoplasmic and nuclear (N) compartments. Staining in oocytes became progressively undetectable whereas it appeared in granulosa (GC) and outer theca cells (oTC) of early (C, c) and more advanced vitellogenic follicles (>2 mm in \emptyset , D, d). Similarly, Nanos1B was detected in oocytes of primordial follicles (A', a'). In previtellogenic follicle (B', b'), Nanos1B presented a major expression in oocyte nucleus (N). Finally, Nanos1B was observed in granulosa cells (GC) and outer theca cells (oTC) in vitellogenic follicles (C', c' and D', d'). BL: basal lamina, GC: granulosa cells, iTC: inner theca cells, N: nucleus, Oo: primary oocyte, oTC: outer theca cells, ZP: zona pellucida.

Supplementary Figure S1: Genomic location of nanos2 gene in Vertebrate species.

The *nanos2* orthologs and their neighbouring genes, illustrated in specific coloured boxes, were mapped. Vertebrate representative species were chosen among Agnatha, Chondrichthyes and Osteichthyes. The figure was not drawn to scale. The name of each scaffold or chromosome harbouring the synteny is indicated at the top for each species whereas gene and protein accession numbers are

detailed at the bottom. Concerning dogfish, whale shark, elephant shark and xenopus tropicalis, nanos2 was localized on a too short chromosomal fragment to identify neighbouring genes. Gene synteny was well conserved between human, coelacanth and spotted gar but only sympk gene was found in the vicinity of nanos2 in zebrafish. Note that the synteny appears disrupted in stickleback.

Supplementary Figure S2: Syntenic genomic location of nanos3 gene in Gnathostomes.

The nanos3 orthologs and their neighbouring genes, illustrated in coloured boxes, were mapped. Vertebrate representative species were chosen among Agnatha, Chondrichthyes and Osteichthyes. The figure was not drawn to scale. The name of each scaffold or chromosome harbouring the synteny is indicated at the top for each species whereas gene and protein accession numbers are detailed at the bottom. Gene synteny was well conserved from Chondrichthyes (whale shark and elephant shark) to Osteichthyes both in Sarcopterygii (coelacanth, xenopus, turtle and human) and Actinopterygii (spotted gar, zebrafish and stickleback). In dogfish, nanos3 was localized in a too short chromosomal fragment to identify neighbouring genes.

Supplementary Figure S3: Phylogenetic trees illustrating the evolutionary relationship between the Nanos sequences.

Nanos protein sequences were aligned using BioEdit ClustalW multiple alignment editor and phylogenetic trees were built using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 7.0. Trees were constructed using the Neighbour-Joining method and the reliability of the inferred trees was assessed using the bootstrap procedure with 1000 replications. The scale bar indicates the number of expected amino acid substitutions per site per unit of branch length. For each species and each Nanos paralogous protein, sequence accession numbers were listed in Supplementary Table S5. The phylogenetic tree was rooted using the drosophila Nanos sequence (A). Sequences corresponding to Nanos2 and Nanos3 in different species have been compressed to focus the study on Nanos1 sequences. Chondrichthyan and osteichthyan Nanos1 sequences segregate

together but two distinct Nanos1A and Nanos1B clusters (shaded boxes) are observed. Due to their high inter-species conservation, Nanos1B sequences of Osteichthyes were compressed in this global tree. Another secondary phylogenetic tree was built to investigate further the nanos1B gene duplication in Teleosts (B). This tree was rooted using the Nanos1B protein sequence of a Lepisosteiforme, the spotted gar, an out-group species to Teleosts which did not undergo the Teleost specific third whole genome duplication (termed 3R). Nanos1Ba and Nanos1Bb sequences segregate together inside different clades: Acanthopterygians, Cypriniformes, Salmoniformes and Osteoglossiformes respectively (shaded boxes) suggesting that nanos1Ba and nanos1Bb are ohnologs resulting from the nanos1B duplication. Note that no zebrafish nanos1Bb gene was identified from transcript (mRNA, EST, RNAseq) or genome libraries.

Supplementary Figure S4: Amino acid alignment of Nanos1 sequences reveals a higher conservation of Nanos1B sequences compared to Nanos1A.

Nanos1 complete protein sequences of representative vertebrate species were aligned using BioEdit ClustalW multiple alignment editor. Identical and similar residues are shaded in black and grey respectively following a 40% threshold. Nanos1A and Nanos1B are both detectable in chondrichthyan species such as dogfish and osteichthyan species such as coelacanth and spotted gar whereas the second duplicated gene copy (Nanos1Ba/b) is restricted to teleostean fish such as arowana and salmon, which have lost Nanos1A. The accession numbers of the selected proteins are detailed in Supplementary Table S5. The two Nanos specific CCHC zinc finger motifs are indicated at the carboxy terminal end of Nanos1A and Nanos1B proteins (black asterisks, zinc finger motif 1; grey asterisks, zinc finger motif 2). Nanos1B proteins show a higher conservation compared to Nanos1A proteins. For example, coelacanth Nanos1A presents only a mean of 7% identity and 16% similarity with the other selected Nanos1A whereas Nanos1B presents respectively 34% identity and 43% similarity with the other selected Nanos1B sequences.

Supplementary Table S6: Nucleotide sequences of the primer sets used for real-time quantitative PCR and riboprobes synthesis.

Primer sequences and PCR product sizes are indicated for each gene. A cDNA library previously established 21 was used with M13Fwd/Rev primers to produce riboprobes for in situ hybridization.

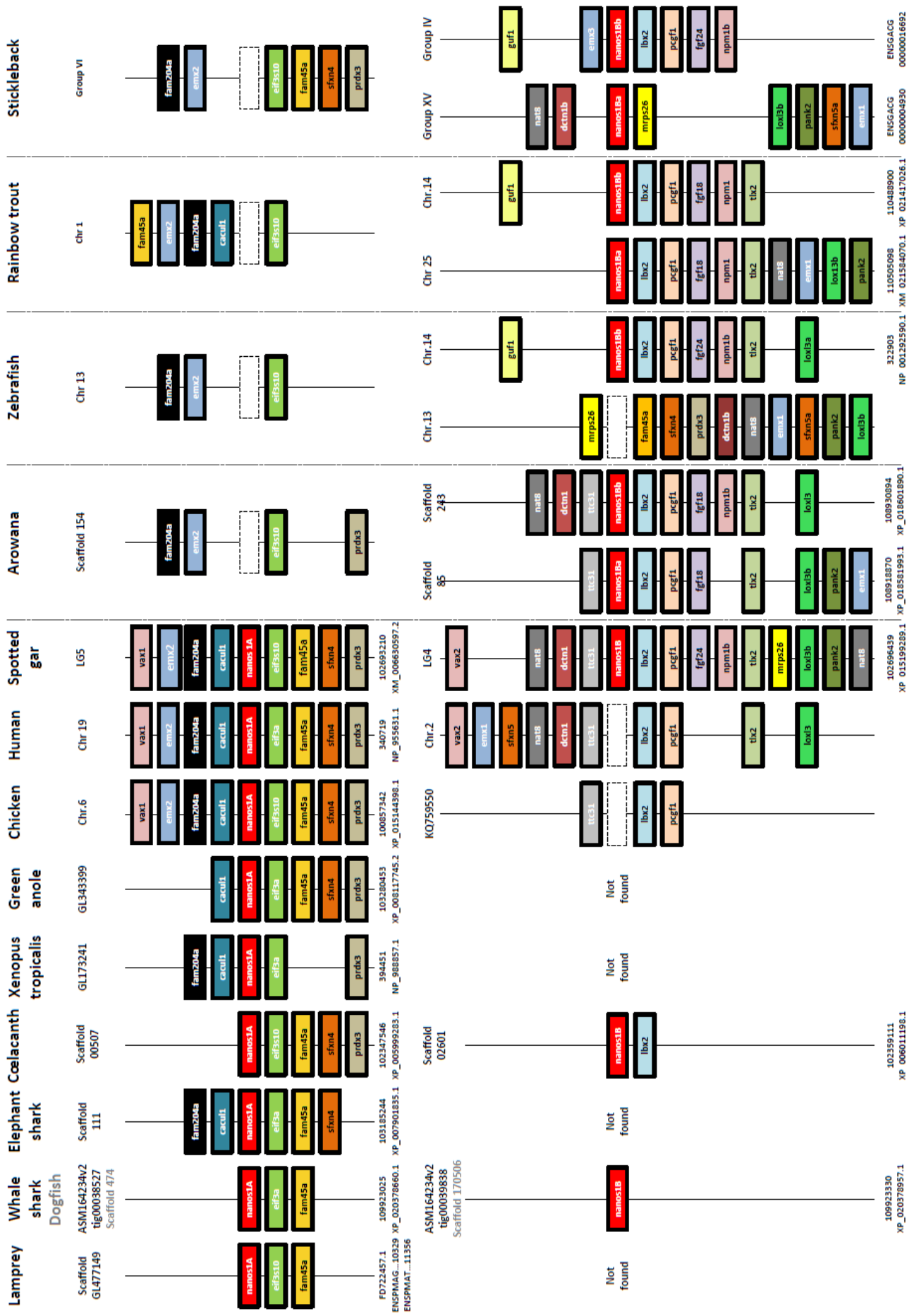


Figure 1

nanos1 genes

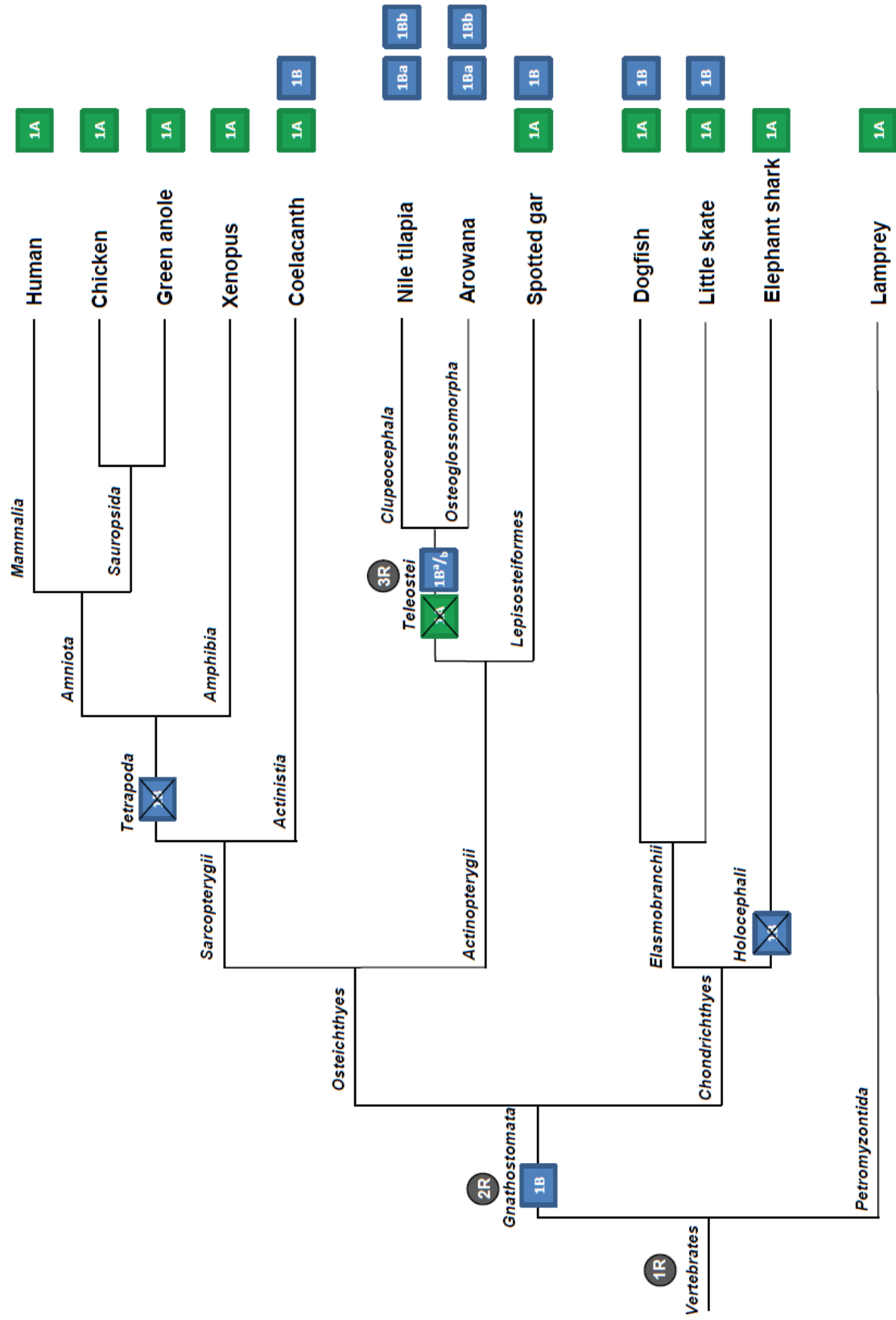


Figure 2

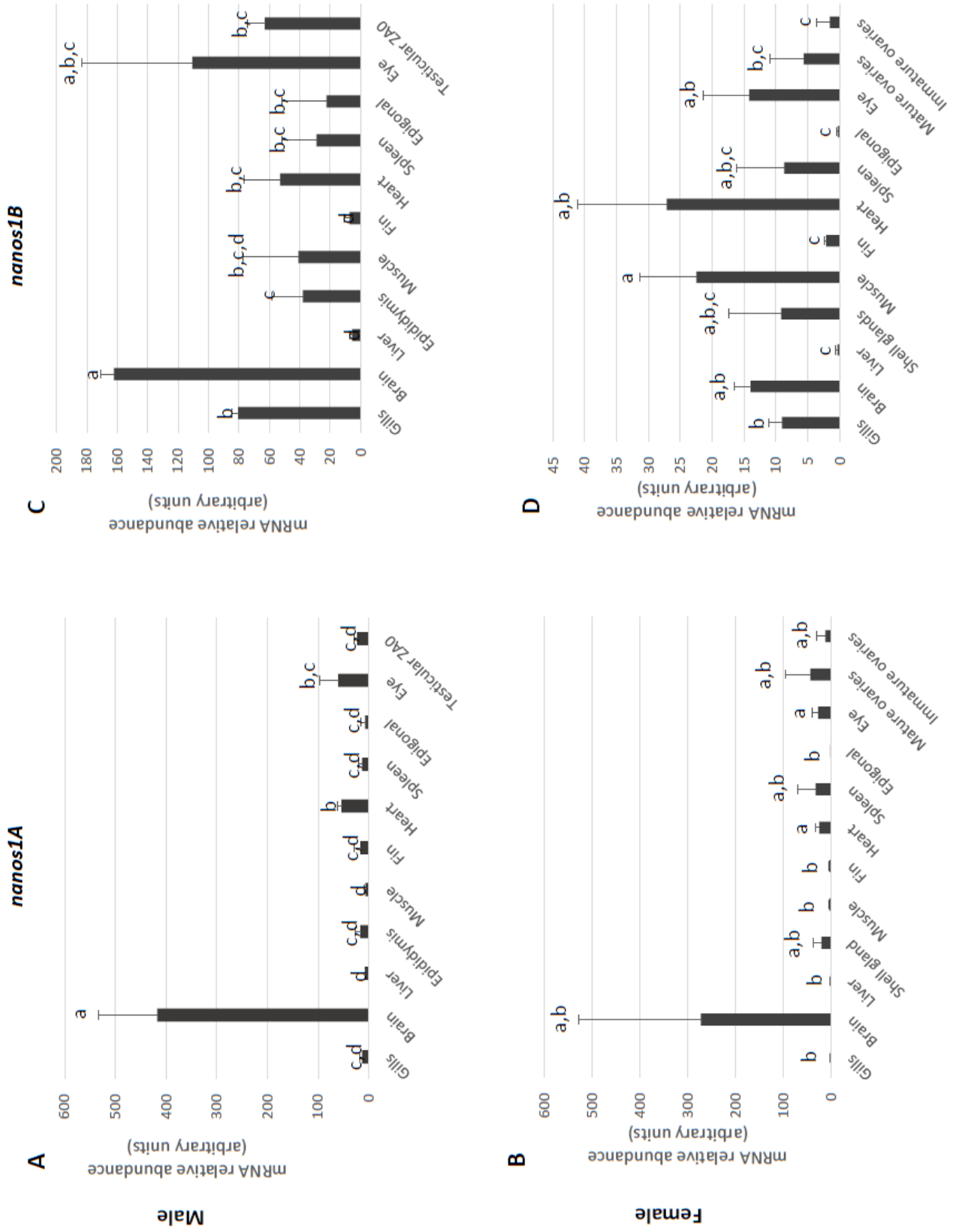


Figure 3

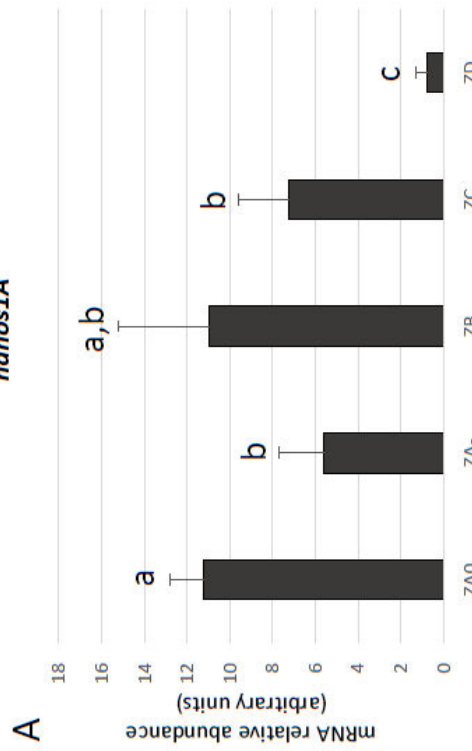
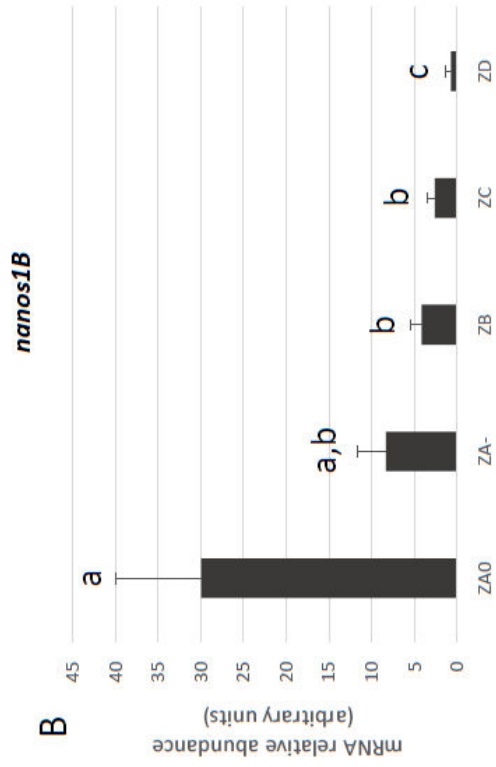


Figure 4

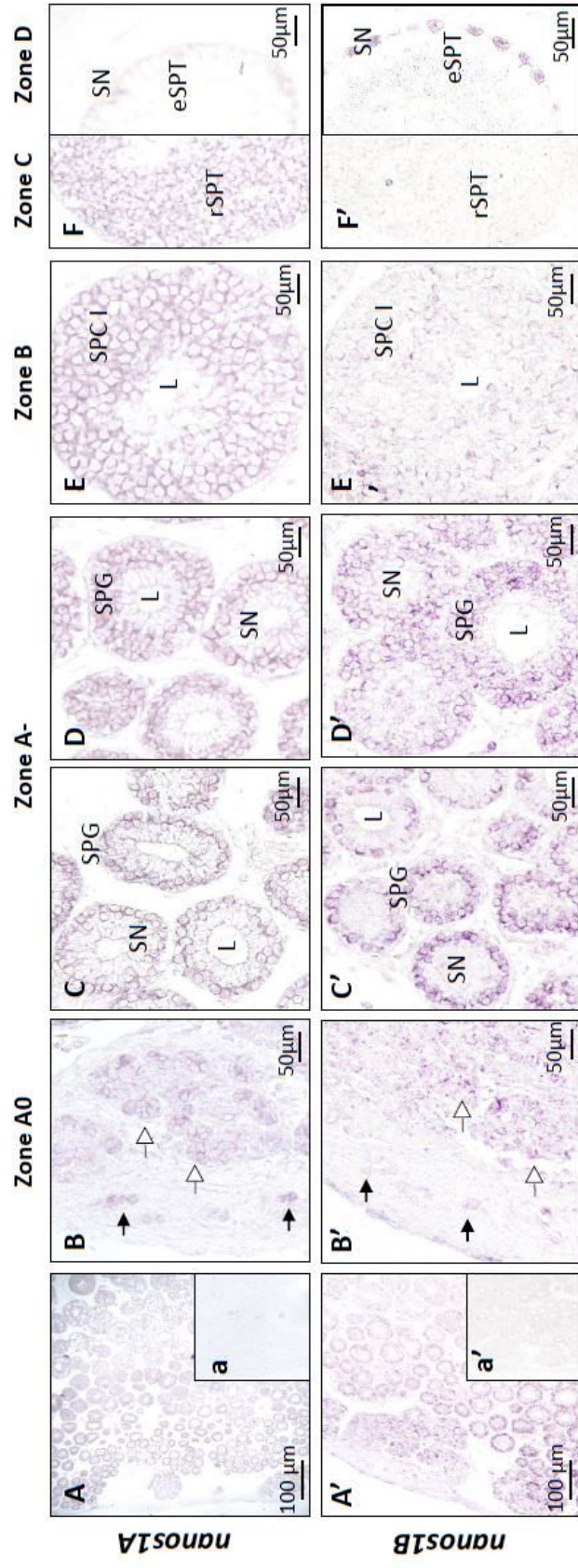


Figure 5

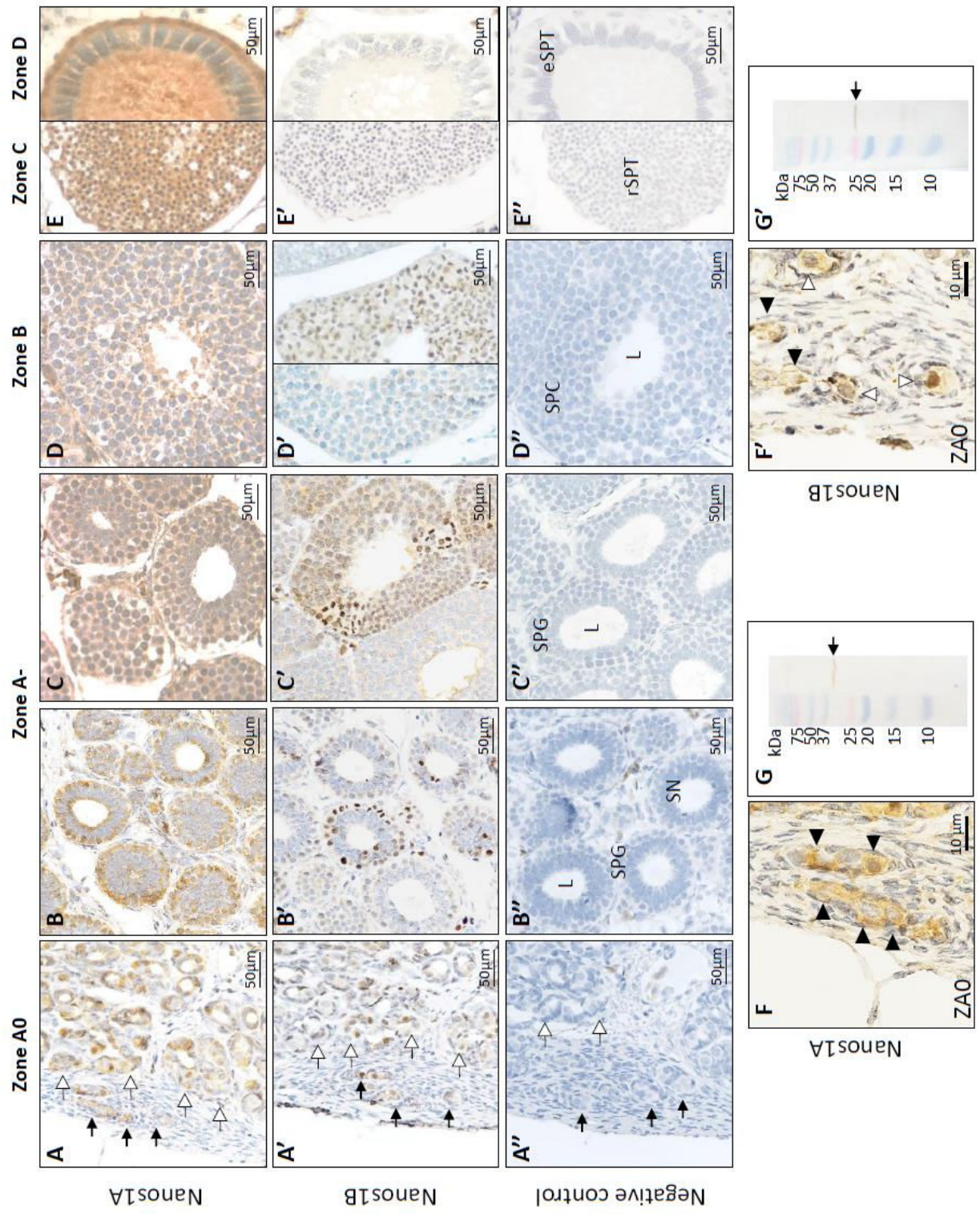


Figure 6

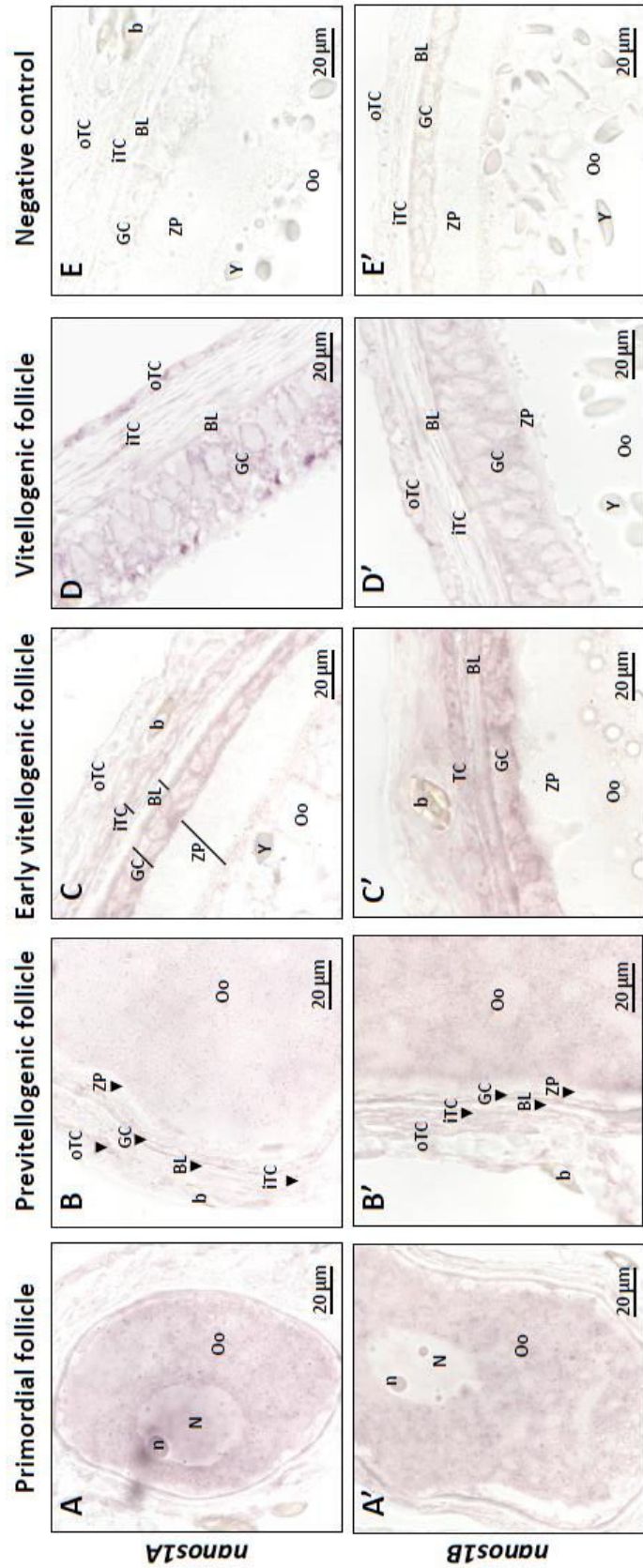


Figure 7

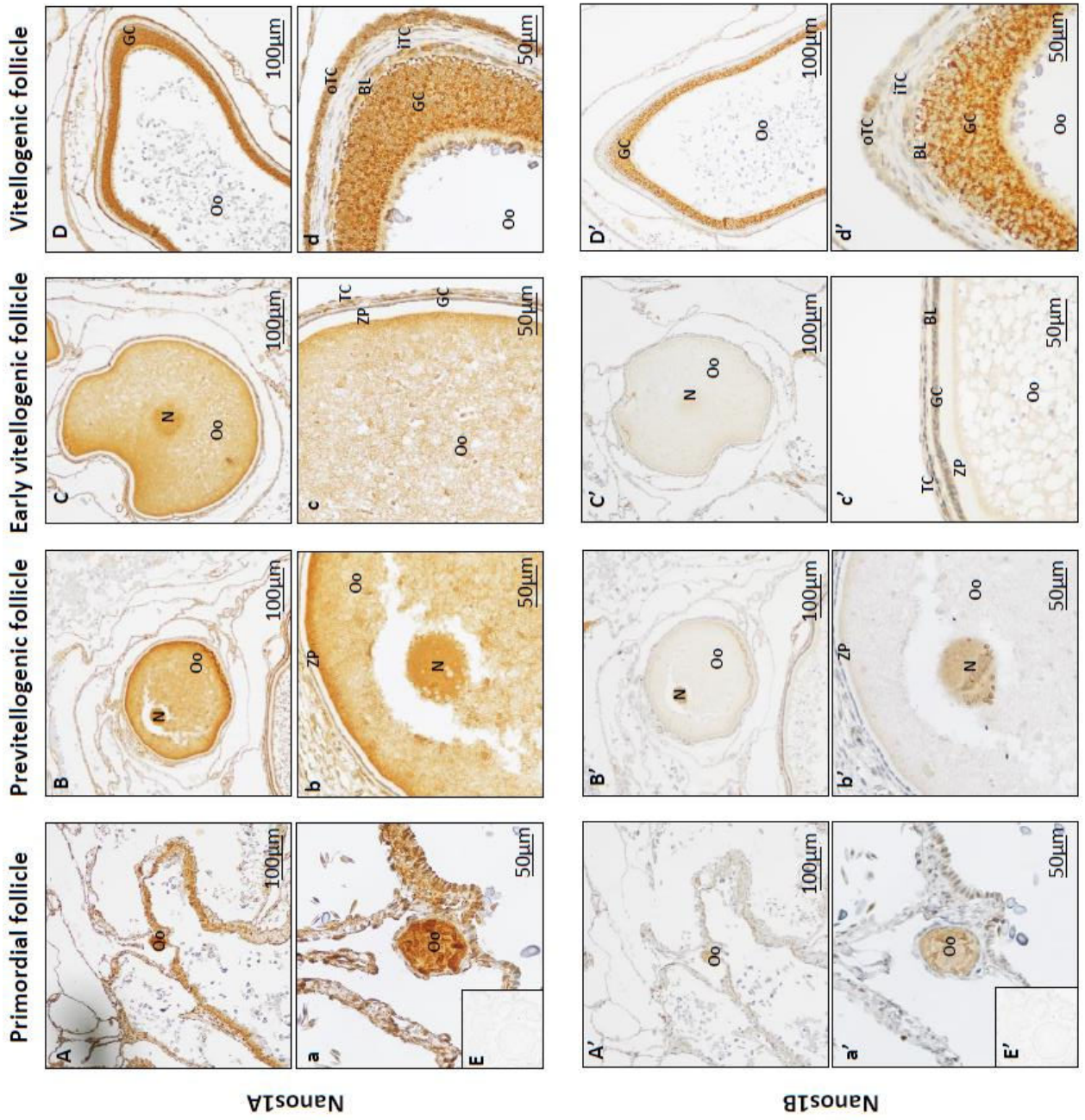
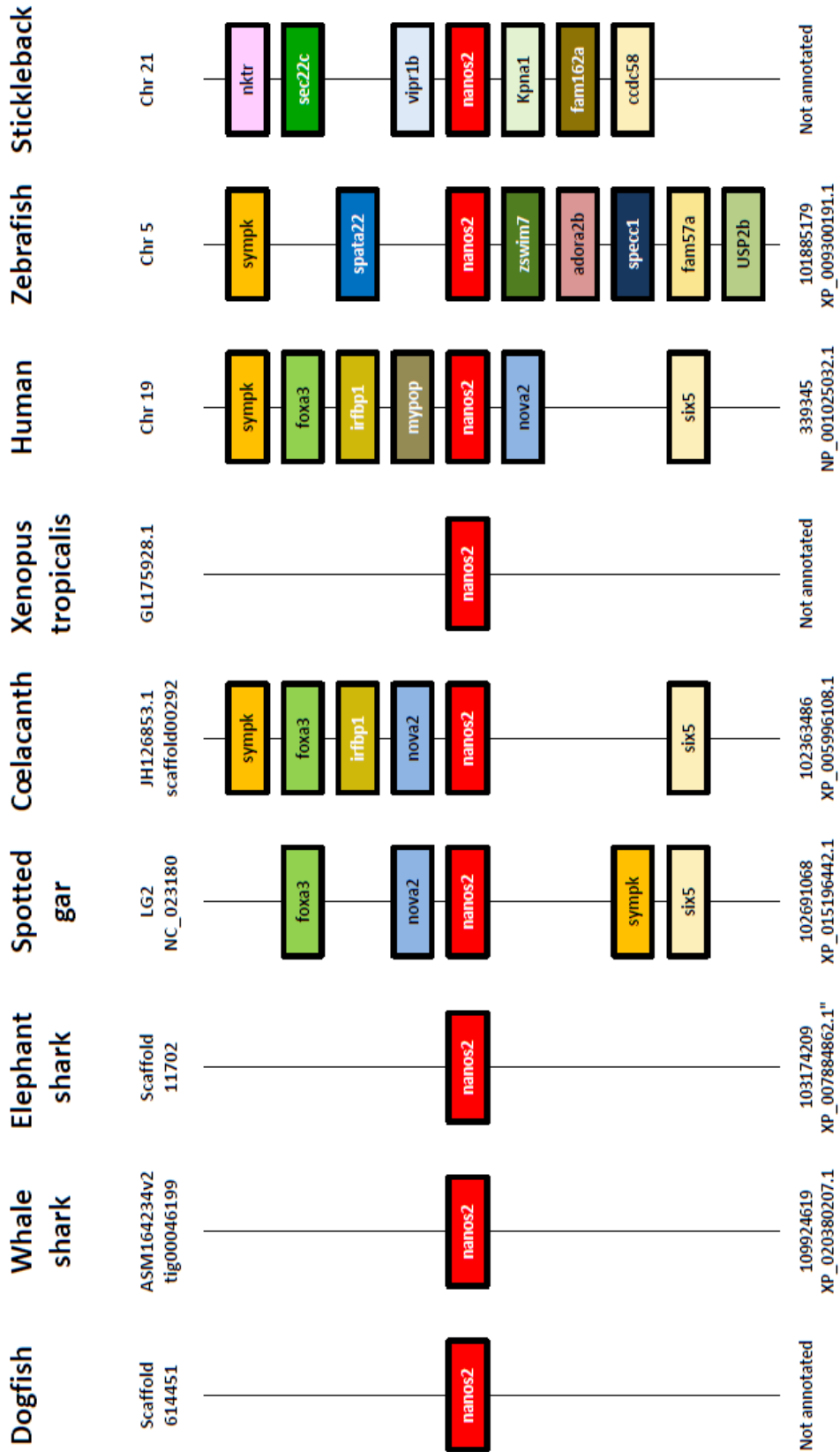
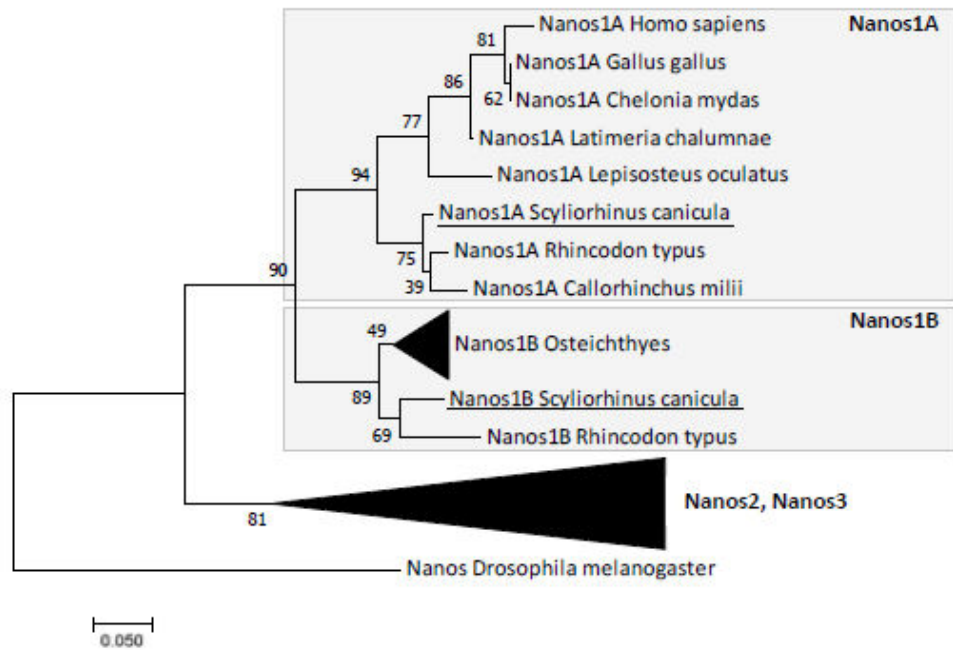


Figure 8

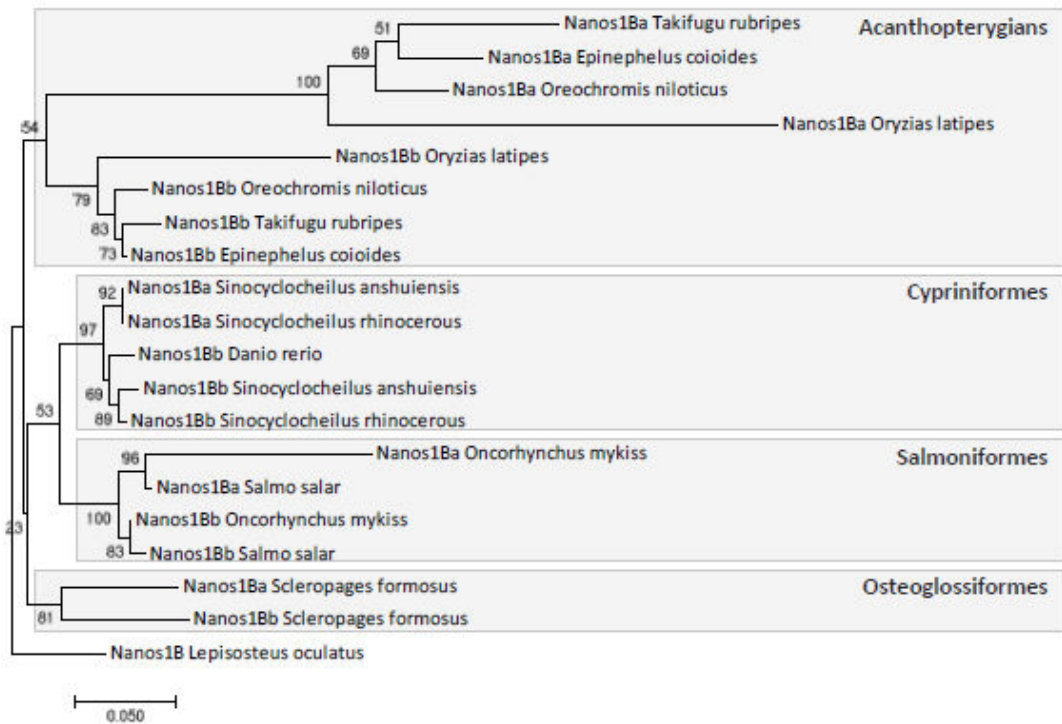


Supplementary figure S1

A



B



Supplementary figure S3

| species | Nanos(1A) | Nanos1B(a) | Nanos1Bb | Nanos2 | Nanos3 |
|-------------------------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|--------------------|
| <i>Anguilla anguilla</i> | | scaffold_2622 | scaffold_332 | scaffold_4180 | |
| <i>Callorhynchus milii</i> | XP_007901835.1 | | | XP_007884862.1 | NW_006890233* |
| <i>Chelonia mydas</i> | XP_007064298.1 | | | XP_007071042.1 | XP_007066396.1 |
| <i>Danio rerio</i> | | | NM_001305661.1 | DAA64468.1 | NP_571953.1 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | NP_476658.1 | | | | |
| <i>Epinephelus coioides</i> | | ARU80562.1 | ARU80563.1 | ARQ20695.1 | ARU80564.1 |
| <i>Gallus gallus</i> | XP_015144398.1 | | | | |
| <i>Homo sapiens</i> | NP_955631.1 | | | NP_001025032.1 | NP_001092092.1 |
| <i>Latimeria chalumnae</i> | XP_005999283.1 | XP_006011198.1 | | XP_005996108.1 | ENSLACP00000015098 |
| <i>Lepisosteus oculatus</i> | XM_006630597.2 | XP_015199289.1 | | | |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | | XP_021439740.1 | XP_021417026.1 | XP_021428629.1 | XP_021423321.1 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | | XP_005467279.1 | XP_003447814.1 | XP_005448912.2 | XP_005460610.1 |
| <i>Oryzias latipes</i> | | AB437935.1 | NM_001160469.1 | | |
| <i>Rhincodon typus</i> | XP_020378660.1 | XP_020378957.1 | | XP_020380207.1 | NW_018035638.1 |
| <i>Salmo salar</i> | | XP_014067484.1 | NM_001141585.1 | XP_014033933.1 | AGG35558.1 |
| <i>Scleropages formosus</i> | | XP_018581993.1 | XP_018601890.1 | | XP_018620400.1 |
| <i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i> | | XP_016329477.1 | XP_016305716.1 | XP_016311246.1 | XP_016361995.1 |
| <i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i> | | XP_016377827.1 | XP_016370734.1 | XP_016397459.1 | XP_016417115.1 |
| <i>Scyliorhinus canicula</i> | under submission | under submission | | under submission | under submission |
| <i>Takifugu rubripes</i> | | XP_011618819.1 | XP_011609291.1 | XP_011606249.1 | |

* Not annotated

Supplementary table S5

Chapitre 2

CHAPITRE 2

Characterization of potential spermatogonial stem cells and development of their transplantation in the little spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*.

Laura GRIBOUVAL ; Aude GAUTIER ; Cécile GUIARDIERE ; Pierrick AUVRAY ; Pascal
SOURDAINE

Dans un contexte où de plus en plus d'espèces sont en voie de disparition, la mise en place de plans de sauvegarde d'espèces menacées est cruciale. La classe des Chondrichthyens, qui regroupe les requins, les raies et les chimères, est fortement impactée avec un quart de sa population en danger d'extinction d'après l'UICN. Or, des études menées sur les cellules souches spermatogoniales (SSC) chez des poissons téléostéens ont montré leur intérêt potentiel dans la préservation d'espèces. En effet, la transplantation de SSCs dans des individus receveurs permet de générer des gamètes possédant le patrimoine génétique de l'espèce donneuse. Selon le sexe du receveur, les SSCs transplantées génèrent des gamètes mâles ou femelles. De plus, Okutsu *et al.* ont également montré que la transplantation interspécifique de SSCs de truite chez le saumon permettait également de générer ces deux types de gamètes ainsi qu'une descendance F1 issue du donneur. Enfin, la xénotransplantation a été menée sur des espèces en danger et s'avère prometteuse pour la préservation d'espèces (Lee and Yoshizaki, 2016). Chez les requins, des SSCs potentielles ont été préalablement identifiées dans le testicule de petite roussette par des approches morphologiques et moléculaires (Loppion *et al.*, 2008; Bosseboeuf *et al.*, 2014a). Ces cellules ont été isolées puis maintenues en culture pendant plusieurs mois dans un milieu spécifique supplémenté en GDNF. Ce maintien à long terme en culture a conforté l'hypothèse que les cellules cultivées étaient des cellules souches (Gautier *et al.*, en 2014).

L'objectif de cette étude était d'une part, de mieux caractériser les SSCs potentielles de petite roussette au niveau moléculaire, notamment en ce qui concerne l'expression de facteurs de pluripotence. D'autre part, il s'agissait de mettre au point un protocole de transplantation pour la première fois chez une espèce de Chondrichthyen afin de valider le caractère souche des SSCs potentielles cultivées. Ainsi, deux nouveaux marqueurs de SSCs ont été caractérisés chez cette espèce par immunohistochimie sur coupes testiculaires, l'antigène de surface SSEA4 et le facteur de transcription Sox2. SSEA4 a une expression limitée aux spermatogonies de la niche et des premiers cystes, comme Sox2, mais ce dernier maintient son expression à un niveau plus faible dans les spermatogonies en différenciation. Au contraire, le facteur régulateur de la transcription ID4, décrit comme marqueur des SSCs chez la souris (Oatley *et al.*, 2011), a présenté un profil d'expression très large dans la lignée germinale mâle chez la petite roussette. Par la suite, une caractérisation des SSCs a été menée

in vitro afin de déterminer si après une semaine de culture, ces cellules gardaient leur caractère souche en exprimant des marqueurs de pluripotence. Par double marquage en immunocytochimie, il a été montré que les cellules cultivées exprimaient des facteurs de pluripotence comme Pou2 ou SSEA4, mais aussi d'autres marqueurs caractéristiques des cellules souches spermatogoniales (GFR α 1, c-Kit, Nanos1). Enfin, l'établissement d'un protocole de transplantation de SSCs chez la petite roussette a nécessité un remaniement important des protocoles disponibles du fait des différences morphologiques et cellulaires entre les poissons téléostéens et les Chondrichthyens. Les limites rencontrées et les avancées dans la mise au point de ce protocole chez la petite roussette sont détaillées dans ce chapitre. Le succès de la transplantation de SSCs chez la petite roussette est un challenge à relever pour valider le caractère souche des spermatogonies cultivées, mais aussi pour ouvrir de nouvelles perspectives en terme de préservation d'espèces.

Characterization of potential spermatogonial stem cells and development of their transplantation in the little spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*.

AUTHORS

Laura GRIBOUVAL^{1,2}; Aude GAUTIER¹; Cécile GUIARDIERE²; Pierrick AUVRAY²; Pascal SOURDAINE¹

AFFILIATION

¹ Normandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), CS14032, 14032 CAEN, Cedex 5, France

² KELIA, Parc Technopolitain Atalante Saint Malo, 35400 Saint Malo, France

***CORRESPONDING AUTHOR**

Pascal SOURDAINE : Normandie Univ, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), CS14032, 14032 CAEN, Cedex 5, France

Tel : (00 33) 2 31 56 56 87

KEYWORDS

Spermatogonial Stem Cells, Chondrichthyes, Transplantation, Shark

Abstract

While more and more species are considered endangered, the establishment of safeguarding plans are crucial. The Chondrichthyes, cartilaginous fish comprising rays, skates, sharks and chimaeras are highly affected as about a quarter of them are currently threatened. Recently, numerous studies highlighted the possible contribution of Spermatogonial Stem Cells (SSCs) transplantation to preserve endangered fish species. In recent studies performed on the little shark *Scyliorhinus canicula*, potential SSCs (pSSCs) have been identified based on morphological and molecular criteria and on their long term maintenance in culture. This work followed on this characterization and aimed to evaluate *in situ* and *in vitro* expression of pSSCs pluripotency markers, and to establish a protocol of SSC transplantation in dogfish. First, the cell surface glycosphingolipid Stage Specific Embryonic Antigen 4, SSEA4, and the transcription factor Sox2 were identified as two new markers of pSSCs in this species. These markers were still expressed in pSSCs in culture. Finally, several key steps of the SSC transplantation protocol have been optimized. The progress and limits that have been encountered were discussed. The establishment for the first time of a transplantation protocol for this species will open up new perspectives in the safeguarding of chondrichthyan species.

Introduction

Spermatogonial stem cells (SSCs) are at the origin of spermatogenesis. They maintain male gametogenesis by self-renewal and generation of spermatogonia committed to differentiation, allowing the fertility of males during their life. Morphological characterizations by photonic and transmission electron microscopy observations in different species revealed that SSCs are round large cells, in relative to other testicular cells, with a large nucleus composed of mottled chromatin (Chiarini-Garcia and Russell, 2002; Leal *et al.*, 2009). SSCs molecular markers were next identified such as *Nanos2*, which is expressed in a subpopulation of undifferentiated spermatogonia in trout (Bellaiche *et al.*, 2014), and works as an intrinsic factor to maintain SSCs population during spermatogenesis in mice (Saga, 2010). The pluripotency marker Oct4/Pou5f1 is implicated in SSCs self-renewal in mice and is also expressed in fish, for example in medaka SSCs (*Pou2*) (Froschauer *et al.*, 2013). In mice, it has been shown that GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) promotes self-renewal of SSCs by binding GFR α 1 receptor and RET co-receptor activation (He *et al.*, 2007). In fact, GFR α 1 appears as an highly conserved SSCs molecular marker in Vertebrates, including fishes (Santos Nassif Lacerda *et al.*, 2013). Finally, as stem cells, SSCs are characterized by possible long term *in vitro* maintenance when cultivated in an appropriate medium (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2011).

In 1994, Brinster and Avarbock developed spermatogonial stem cells transplantation in mouse, a reproductive functional test to confirm SSC stemness. This technique consists in injecting potential SSCs in a recipient having few or no germ cells, the injected SSCs then colonize the recipient seminiferous tubules and differentiate into mature gametes. The transplantation technique can therefore result in the production by the recipient of fertile spermatozoa that carry the donor genotype. This technique has been then extended to other species like fishes for aquaculture purposes (Lacerda *et al.*, 2013) or for safeguarding of endangered species (Ye *et al.*, 2017) and, therefore, enabled major advances in elucidating SSCs identity and mechanisms that regulated the functions of these cells. First, transplantation in zebrafish revealed that donor derived spermatogonia transplanted in male or female recipients produced sperm and eggs respectively (Nobréga *et al.*, 2010). Moreover,

a recent study revealed that spermatogonia derived from whole rainbow trout that has been frozen for 1,113 days gave rise to functional eggs and sperm after transplantation opening up a new opportunity in the conservation of species (Lee *et al.*, 2015). Among the endangered fish species, the class of Chondrichthyes includes 1271 species of skates, rays, sharks and chimaeras, whose only one-third is considered safe (Dulvy *et al.*, 2014). The characterization of SSCs in these cartilaginous fish could therefore be of first importance for their conservation.

In the little shark *Scyliorhinus canicula*, spermatogenesis occurs synchronously within cysts in a polarized testis. Because of this specific organization, the testis can be subdivided in 5 zones, from the dorsal to the ventral part of the testis. These zones correspond to the different stages of spermatogenesis. The zone A0 contains the potential SSCs, A_{pr} and A_{al} spermatogonia associated to Sertoli cells in a dense connective tissue. This area runs the dorsal length of the testis and is isolated from the rest of the testis by a large testicular blood vessel. Somatic and germinal cells leave this niche and proliferate actively to form spermatocysts, which progressively proceed in maturational order towards the opposite margin of the gonad. The unit structure of the spermatocyst is the spermatoblast which is composed of one germinal clone associated to one Sertoli cell. Both cell types proliferate until the cyst reach about 500 spermatoblastes. At this stage, Sertoli cells stop to proliferate and undifferentiated spermatogonia have undergone nine divisions from the A single cell, they start to differentiate synchronously within the cyst (Bosseboeuf *et al.*, 2014). In dogfish, like in Osteichthyes, potential spermatogonial stem cells are large cells surrounded by Sertoli cells, their nucleus has mottled chromatin with a nucleolus, and they also present a dense material associated to mitochondria, the germinal nuage (Loppion *et al.*, 2008). The genes *pou2*, *gfra1* and *nanos1B* were shown to be specifically expressed in undifferentiated spermatogonia with a high expression in pSSC (Bosseboeuf *et al.*, 2014, unpublished data). However, PLZF (Promyelocytic leukaemia zinc finger protein) which is a SSC marker in mice (Hermann *et al.*, 2010) presented a broad distribution from pSSCs to leptotene spermatocytes in *S. canicula* (Bosseboeuf *et al.*, 2014). Finally, the addition of GDNF to potential SSCs culture, allowed their proliferation and their survival in a dose dependent manner

(Gautier *et al*, 2014). By this way, pSSC culture could be maintained for three months suggesting a conservation of the GDNF/GRF α 1 signaling in chondrichthyes and supporting the hypothesis of their stemness potential.

In this study, we identified by immunohistochemistry two new markers, Sox2 and SSEA4, that were specifically expressed in undifferentiated spermatogonia of *S. canicula*. In order to better characterize the dogfish pSSCs maintained *in vitro*, analysis of these new markers by immunocytolabelling and telomerase activity test were performed. Finally, transplantation of dogfish pSSCs was initiated and preliminary results concerning the development of key steps are presented like the PKH26 labelling of pSSCs, the determination of embryonic stages for microinjection and phenotype analysis, as well as the embryo microinjection and maintenance.

Material and methods

Animals

Adult male and female dogfish *Scyliorhinus canicula* were captured from the English Channel using the facilities of the Lycée Maritime et Aquacole (Cherbourg, France). The aquarium La Cité de la Mer (Cherbourg) first stored them in natural seawater tanks waiting their transfer to the Centre de Recherches en Environnement Côtier (Luc sur Mer, France). Sharks were allowed to acclimate for at least 2 weeks before testes sampling and were euthanized by percussive blow to the head followed by sectioning of the spinal cord and pithing. All the procedures were performed according to the European directive 2010/63/UE for care and use of animals. The personnel were trained and qualified for animal experimentation. Testes were directly transferred into Gautron buffer (Loir and Sourdaie, 1994a) complemented by 58 mM trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) supplemented by antibiotics (0.06 μ g/ml penicillin, 0.1 μ g/ml streptomycin, and 100 μ g/ml amphotericin B).

Immunohistochemistry

Dogfish testis cross sections were cut from paraffin blocks and placed on polysine-coated slides. These 3- μ m sections were deparaffinized in Roti[®]-Histol baths and rehydrated by a series of ethanol dilutions. Antigen unmasking was performed by a microwaves heating followed by a cooling for 1 h at room temperature (RT). Endogenous peroxidase activity was blocked by a bath of 30 min in 3% hydrogen peroxide /PBS, and the saturation of aspecific sites was performed by 30 min incubation in 1% BSA (w/v) /triton 0.1% (v/v) /phosphate-buffered saline (PBS). Heterologous primary antibodies were used: a mouse monoclonal anti-SSEA4 antibody (1/50 dilution, Abcam, ab16287), a rabbit polyclonal anti-Id4 antibody (1/100, Abcam, ab86113) and a rabbit polyclonal anti-Sox2 antibody (1/250, Abcam, ab97959). They were diluted in blocking solution and incubated overnight at 4°C. Sections were rinsed and incubated for 2h at RT with the secondary swine polyclonal antibody anti-rabbit immunoglobulins conjugated to HRP (1/200 dilution, PO599, Dako, Glostrup, Denmark) or the goat antibody anti-mouse immunoglobulins conjugated to HRP (1/200 dilution, n°31430, Thermo Scientific, Rockford, USA). Sections were mounted in moviol medium. Images were made using a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with NIS-Elements D 3.0 software (Nikon Instruments, Japan).

Potential spermatogonial stem cells primary culture

Testis dissection began with the removal of the tunica albuginea. Testes were then cut in 2 mm slides over their entire length. Each slice was dissected in order to recover only the zone A0, located above the dorsal blood vessel, and which contained the potential stem cells. The sample was subsequently placed in 3ml Gautron medium containing 0,1% collagenase and 0,05% Dnase1 to initiate the dissociation of the cells. The dissociation was continued by mechanical dissociation using an optical chisel and then gentle agitation of the cells in 10 ml of dissociation medium was performed for three hours at room temperature (RT). Dissociated cells were recovered, rinsed in Gautron and put in Gautron medium enriched with serum (1% FBS, 0.5% BSA and 2% decomplexed dogfish serum) overnight at 17°C. Cells were collected and filtered on 100 μ m filter. A differential plating was performed in a gelatinated flask overnight at 17°C. The third day, cells were removed from the flask

while limiting the recovery of somatic carpet and centrifuged at 300g for 2min. Cells were then cultured in Gautron medium complemented with antibiotics and serum (1% FBS, 0.5% BSA, 0.25% decomplexed dogfish serum), supplemented with L15 medium (20Mm Hepes, 1% FBS, 0.5% BSA, 0.25 % decomplexed dogfish serum, 58 mM TMAO, 330 mM Urea, 280 mM NaCl, 4.6 mM Dextrose) (v/v : 1/1) and GDNF 10 ng/ml in a gelatinated support (flask, multi well plates,..) for at least one week.

Immunocytochemistry

After one week culture, cells were fixed in PFA 4% in PBS for 15 min at RT. The supernatant was removed and cells were rinsed twice in PBS BSA 1% triton 0.05% for 5min at 4°C. Cells were then incubated with the primary antibody diluted in PBS BSA 1%, a mouse monoclonal anti-SSEA4 antibody (1/50 dilution, Abcam, ab16287), a rabbit polyclonal anti-GFR α 1 antibody (1/100 dilution, Abcam, ab84106), a rabbit polyclonal anti-Oct4 antibody (1/200 dilution, Abcam, ab53028), a rabbit polyclonal anti-Nanos1(A) antibody (1/50 dilution, sc-366152, Santa Cruz Biotechnology), a rabbit polyclonal anti-Nanos2 (anti-dogfish Nanos1B) antibody (1/50 dilution, ab174139, Abcam) and a rabbit polyclonal anti-c-Kit antibody (1/50 dilution, sc-168, Santa Cruz Biotechnology) for one hour in a humid chamber at RT. The preparation was rinsed for 5 min in PBS BSA 1% and then incubated with secondary antibodies in PBS BSA 1% for 30 min in a humid chamber at RT. Goat polyclonal anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (A-11008, ThermoScientific, Rockford, USA) and goat polyclonal anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor 594 (A-21203, ThermoScientific, Rockford, USA) were both diluted at 1/200. After washes, sections were mounted in DAPI mounting medium (P36931, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). Images were acquired using a confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000) equipped Olympus FluoView 4.2 software.

Telomeric repeat amplification assay by TRAP

Cultivated cells were aliquoted in 1 000 000 cells / tubes and centrifuged at 850 rpm for 5min. The pellet was rinsed two times in cold PBS and resuspended in 200 µl of cold lysis buffer (0.5% CHABS, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 5 mM β-Mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, 10% Glycérol) for 30 min. Cellular suspension was centrifuged for 20 min at 4°C and the supernatant was collected. The extract was immediately use for the telomerase extension. Positive control was the MCF7 human breast cancer cell line. Negative controls were extracts heated at 95°C for 10 min to inactivate the enzyme. Two µl of telomerase extract of each sample were added to the RNA secure solution (20mM Tris-HCl pH = 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0.005% Tween20, 1 mM EGTA, 0.1 mg/ml BSA, 0.2 mM dNTP, 200 nM TS primer (5'-AAT-CCG-TCG-AGC-AGA-GTT-3')) and incubated at 30°C for 60 min in a thermocycler. Detection of telomerase activity was performed by TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol). Telomerase product (2.5 µl) was diluted 1:10 in the TRAP solution (1X, Go Taq flexi buffer, 1.5mM MgCl, 0.4 µM TS primer, 0.4 µM ACX primer (5'-GCG-CGG-CTT-ACC-CTT-ACC-CTT-ACC-CTA-ACC-3'), 0.2 mM for each dNTP, 0.05U Go Taq DNA polymerase). The solution was heated for 2 min at 95°C, a cycle repeated 30 times was composed of 95°C for 30s, 58°C for 30s, 72°C for 30s and then one step of 72°C for 5min. Migration of the PCR extract was performed on 12% polyacrylamide gel (1mm thick) in the migration buffer (TBE 0.5X). Ten µl of PCR product was supplemented with 2 µl of loading dye 6X and deposited in each well. The GeneRuler Ultra Low Range DNA ladder (10150750, Fisher Scientist) was used as a reference. Migration was performed during about 1h30 at 150V. The revelation was performed by SYBR green 1X in TBE 0.5X for 15min. The gel was rinsed twice in water and observed under UV lamp.

Determination of the kinetic of development of dogfish gonads

The establishment of the gonads was evaluated from embryos at stage 22 to embryo stage 31. Dogfish eggs were collected at different times of development based on egg laying date and macroscopic observations of the embryos through the shell. Embryos were removed from the egg shell and euthanized using prolonged 2-phenoxyethanol bath. Embryos were recovered after separating them

from their yolk, photographed and measured. Embryos were staged according previously established criteria (Ballard *et al.* 1993). Eggs were collected for each developmental stage. Embryos were then dehydrated in successive ethanol/PBS solutions (25% ethanol, 50 % ethanol, 75 % ethanol and 100% ethanol) and included in paraffin. Transversal sections 3µm-thick were performed in series from the pectoral fin to the anal fin. Slides were used for Prenant-Gabe coloration and immunohistochemistry according to the protocol described above. A rabbit anti-Vasa antibody (1/500 dilution, NBP1-46504, Novusbio) was used as primary antibody and a goat anti-rabbit immunoglobulin conjugated to Alexa 488 fluorochrome (1/200, A-11008, ThermoScientific, Rockford, USA) as secondary antibody.

PKH26 cell culture labelling

Several adjustments were necessary in order to obtain an optimal PKH26 labeling of the pSSC. After dissociation, pSSCs were cultured for one week and labelled with PKH26 as described below. Cells were dissociated in calcium magnesium free Gauron EDTA for 10min at RT. Then, they were collected in a 1.5ml tube, counted and centrifuged for 5min at 300g at 17°C. The pellet was resuspended in 2.10^{-6} cells /100µl of Diluent C from the PKH26 Red fluorescent cell linker kit (PKH26GL, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). One hundred µl of a mix ($4. 10^{-6}$ M PKH26 in Diluent C) was added to the cell solution and incubated for 10 min. The reaction was stopped by addition of 100 µl of decomplexed dogfish serum. Cells were centrifuged for 10min at 400g and the pellet was rinsed three times with Gauron medium supplemented with serum (1% FBS, 0.5% BSA, 0.25% decomplexed dogfish serum). An aliquot of the solution was deposited on a slide for microscopic observations. Cells were then observed under a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with NIS-Elements D 3.0 software (Nikon Instruments, Japan). The remaining cells were subsequently seeded in gelatinated BD Falcon™ CultureSlides (354114, BD biosciences, Erembodegem, Belgium) at 40,000 cells/well and cultured in Gauron medium with serum and antibiotics supplemented with L15 medium and GDNF (10ng/ml) for at least one week. Labelled cells images were performed using a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with NIS-Elements D 3.0 software (Nikon Instruments, Japan). In parallel, three wells were used to perform

a trypan blue viability test, 50 μ l of cell solutions were mixed with 5 μ l of trypan blue and the counting was performed on Mallassez cells. For the rest of the experiments the pSSC were labeled just after the differential plating and seeded in 6-well plates previously gelatinized in place of BD Falcon™ CultureSlides at 40,000 cells / well.

Transplantation assay

One week PKH26 labelled cells were used for the transplantation. Cells were dissociated by the addition of calcium magnesium free Gautron supplemented with EDTA (3 mM KCl, 280 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄, 4.6 mM dextrose, 20 mM HEPES, 330 mM urea, 58 mM TMAO, 1 mM EDTA) for 10min. Cells were then recovered and centrifuged for 2min at 1000g and the pellet was rinsed twice with serum enriched Gautron medium. Cells were resuspended in Gautron enriched medium at a concentration of 3000 cells/ μ l. Before the transplantation the cell solution was mixed with methylene blue to visualize precisely the injection place.

Different methods of transplantation were tested. Firstly, the embryos and their yolk were removed from their shell and deposited in a watch glass prior to transplantation. Injection was performed in the umbilical cord or in the coelomic cavity, located under the dorsal blood vessel of stage 27 embryos with a microinjector (Eppendorf™ CellTram™ Manual Microinjector, fisher scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) under a binocular loupe (LeycaMz95, Leica Microsystem, Heerbrugg, Switzerland). Less than 1 μ l of cell solution was injected in each embryo. After the transplantation, watch glasses containing the embryos and their yolk were deposited in beakers containing 0.22 μ m filtered sterile seawater under a constant aeration. Due to the fragility of the yolk, embryos died during the first week following transplantation. Paraffin was next added in the watch glasses in order to limit the tension of the yolk membrane but this measure did not increase the embryo survival. Finally, in the third method, a small window was cut in the shell of the egg to reach the embryo. Embryos were anesthetized with 2-phenoxyethanol solution (1/100 in sea water) deposited directly on the egg jelly and the volume of anesthetic was adjusted in function of the mobility of the embryo (around 100 μ l).

Less than 1 µl of cell solution was injected with a microinjector in the intraperitoneal cavity of stage 27 embryos under binocular loupe. Embryos were maintained in their own egg during the transplantation. At the end of the manipulation, eggs were rinsed by addition of filtrated sea water on the embryo. The window was closed with parafilm and the eggs were put in sterilized seawater and maintained at 15°C no more than two weeks. Each two days a monitoring of the fluorescence was performed under binocular loupe (Leica) to evaluate the fate of injected cells in the embryo.

Results

Expression of pluripotency markers in potential spermatogonial stem cells

Immunohistochemistry was performed on dogfish testis sections using heterologous antibodies anti-Sox2, SSEA4, and Id4. Sox2 was expressed in the cytoplasm of germ cells, in the spermatogonia of the niche (Figure 1A and 1a), its expression progressively decreased in zone A-, in early spermatogonia present in cysts in formation (stage II, Figure 1B) and in the first stage of differentiated spermatogonia organized in one or two layers in cysts (stage III, Figure 1C). No labelling was observed in zone B containing spermatocytes (Figure 1D) and in somatic cells. SSEA4 showed a more restricted expression pattern limited to the undifferentiated spermatogonia located in the niche (Figure 1A' and 1a'), those leaving the niche and forming cysts and, at a much lower level, in the undifferentiated spermatogonia of cysts in completion located in zone A- (Figure 1B'). SSEA4 expression is then lost in differentiated spermatogonia and at later stages (Figure 1C' and 1D') and no signal was detected in somatic cells. Finally, Id4 protein was located in the cytoplasm of all types of germ cells from the potential SSCs (Figure 1A'' and 1a'') to elongated spermatids (positive spermatocytes are illustrated in Figure 1D'') and somatic cells showed no expression.

Heterogeneous expression of pluripotency markers in undifferentiated spermatogonia in culture.

Immunocytochemistry was performed on dogfish primary cultures of the testicular zone A0, after enrichment in pSSCs. SSEA4, which had an expression pattern limited to early spermatogonia, was

colocalized with five SSC markers, GFR α 1, POU2, c-Kit, Nanos1A and Nanos1B, after one week of culture, when pSSCs formed colonies on a layer of somatic cells. SSEA4 was exclusively detected in spermatogonia, which are recognizable by their round shape. Somatic cells, characterized by their squamous shape with a very large flattened nucleus weakly labelled with DAPI, gave no signal. GFR α 1 (Figure 2A) and Nanos1B (Figure 2B) showed a larger expression pattern than SSEA4 but also restricted to germ cells. To the contrary, the pluripotency marker POU2 was present in a subpopulation of SSEA4⁺ cells. Both Nanos1A (Figure 2B), and c-Kit (Figure 2A) had the same expression as SSEA4. So, these co-immunolocalizations of SSC markers revealed a heterogeneity within the undifferentiated spermatogonia cultivated.

Cultures enriched in potential SSCs presented high telomerase activity.

Telomerase activity counteracts the shortening of telomeric DNA during replication by adding telomeric repeats sequences to the end of chromosomes in cells with a high of proliferative potential such as embryonic and adult stem cells. This activity was assessed by TRAP assay on one-week pSSCs culture (Figure 2C). This method consisted in three steps: extension, amplification and detection of telomerase products. Telomerase substrate (TS) primer was extended by the telomerase contained in cell extracts, by addition of TTAGGG repeats. After PCR amplification and gel migration, telomerase activity generated a specific scale profile corresponding to the different fragment sizes obtained by the addition of repeated sequences. The pSSCs culture present a high telomerase activity similar to the result obtained for the positive control, MCF7 breast cancer cells. This high activity is revealed by the presence of DNA fragments from 50 bp to over 300 bp that have a scale profile. As expected, no DNA scale was detectable in the negative control, heat-inactivated cell extracts. These results highlight that dogfish spermatogonia in culture have maintained their telomerase activity typical of SSCs.

The dogfish embryonic stage 27 was chosen for SSCs transplantation.

The time of the incorporation of germinal cells in gonadal ridges is classically chosen for SSCs transplantation in fish. The corresponding developmental stage in dogfish was determined by histological analysis in a panel of embryos from stage 22 to 31. Transversal cross sections performed between the pectoral fin and the anal fin of stage 22 and stage 25 embryos revealed no gonadal ridges (data not shown). In contrast, in stage 27 embryos, the gonadal ridges were detectable, protruding in the coelomic cavity, and even contained few germ cells (Figure 3A, upper panel). This developmental stage is characterized by a diamond shaped mouth opening and buds of gill filaments appearing in the spiracular clefts, length is around 2 cm and the embryo aged about one month and half. The presence of gonocytes inside the gonadal primordium was confirmed by immunohistochemistry, Vasa positive cells has been detected in the genital ridges (Figure 3A, lower panel). After transplantation, the colonization and proliferation of SSCs in the host gonad has to be observed, so it was necessary to follow gonads development during few days. Three weeks later, stage 31 embryos harbor an arched shaped mouth opening and eyeballs circled with black pigment. Gonads were much more developed and their dorsal side was enriched in gonocytes in the cortical region. Gonocytes were recognizable by their large and round shape (Figure 3B, upper panel) and by the expression of Vasa protein (Figure 3B, lower panel).

PKH26 labelling of pSSCs for transplantation raised difficulties in dogfish.

Dogfish pSSCs were amplified *in vitro* prior their labelling for transplantation. The establishment of the primary culture included the section of testes in 2 mm-tight slices, the dissection of zone A0 on each slice and the enzymatic dissociation of the cells forming this germinative area. After one night of recovering in a serum-rich medium, cells were filtrated and plated in a gelatinated flask for one night in order to collect the next day a supernatant fraction enriched in germinal cells. After this differential plating, cells were labelled with PKH26 conforming to the manufacturer guidelines. After this treatment, microscopic observation of the cells showed hypertrophied and deformed red fluorescent cells. Following aspiration in a glass microcapillary and deposition on a glass slide, these cells were

disintegrated, so they could not be directly injected in embryos (data not shown). Alternatively, the recovery of cells and PKH26 in Gautron medium was also tested in order to avoid a cellular osmotic choc but this method did not allow the incorporation of PKH26 in cell membranes. However, the labelled pSSCs obtained with the classical protocol rapidly recovered when seeded in gelatinated culture slides in presence of recombinant GDNF and serum. After one week, the good state of the cells was deduced from their round morphology, their high refractivity and also their high level of proliferation as colonies were formed again. Observations under fluorescence microscope also revealed that colonies have kept their PKH26 labelling. Cells were therefore collected and gently dissociated using EDTA. 83% of these cells, including pSSCs and somatic cells, were shown to be viable using a trypan blue viability test and were next used for intra-peritoneal transplantation in stage 27 embryos (Figure 4).

Cell transplantation in dogfish embryos required protocol adaptations.

In dogfish, embryos are protected in a rigid eggshell, prolonged at each side by a pair of tendrils, which did not allow access to the embryo. So, different strategies have been tested in order to make possible the transplantation of cells directly in the coelomic cavity of embryos using a glass microcapillary. First, embryos were completely removed from the eggshell and delicately deposited in a square watch glass before anesthesia and injection. Unfortunately, the yolk membrane was too fragile at this developmental stage and rapidly split open, so embryo did not survive longer than 3 days for injected embryos and one week for non-injected embryos (data not shown). The rupture of the yolk membrane seemed to be due to an important tension on this membrane potentially generated by the absence of the holding jelly naturally present in the eggshell. So, paraffin was next used to model a cavity adjusted to the yolk natural form and size, but this test did not gave better results in term of yolk integrity and embryo survival (data not shown). Finally, embryos were maintained in their own shell during the transplantation, only a window was cut in the eggshell to allow accessibility to the embryo. Some droplets of 2-phenoxyethanol solution were deposited in the open egg until the embryo stopped

moving. SSCs injection was performed in the embryo coelomic cavity beneath the dorsal blood vessel. Less than 1 μ l of a cell solution stained with methylene blue was injected and it rapidly diffused from the anterior to the posterior part of the body cavity where are located the gonadal ridges. Once injected the embryos were packed in parafilm in order to maintain the yolk as well as the jelly which is necessary in the regulation of the embryo osmolarity inside the shell. The parafilm also serve as a protection by limiting egg contamination (Figure 4). During transplantation, no yolk was perforated and almost all embryos were alive with the exception of those which did not support anesthesia. This can be explained by our difficulty to rinse efficiently the egg content. First results showed that non-injected embryo in opened-shell can survive up to one month in sterile seawater but injected embryo did not survive more than 15 days. A monitoring of embryo fluorescence was performed each day post transplantation but no signal was detected in the embryo body, potentially due to the fragility of labelled cell at the time of the injection. To conclude, this latter method seemed to be the more appropriate but more experiments and potential more adjustments are necessary to follow the labelled cells in the host embryo.

Discussion

In this study, we have further characterized spermatogonial stem cells in a Chondrichthyes, the shark *Scyliorhinus canicula*, by *in vitro* and *in vivo* approaches. First, we identified two new specific markers of undifferentiated spermatogonia, SSEA4 and Sox2, by immunohistochemistry. The glycosphingolipid SSEA4 was limited to the germ cells located in the niche of the A0 zone, strongly suggesting that SSEA4 is highly specific of pSSCs as observed in human (Altman *et al.*, 2014). The pluripotency marker Sox2 harbored a broader expression pattern, in pSSCs, early spermatogonia forming cysts and at a lower level in differentiated spermatogonia. The expression of Sox2 by pSSCs in dogfish is in accordance with a study in the rohu carp, in which Sox2 was shown to be expressed in proliferating spermatogonia in culture (Patra *et al.*, 2015). In dogfish, another pluripotency marker, *pou2*, was previously detected specifically in undifferentiated spermatogonia, with variable abundances of transcripts in

spermatogonia of early cysts (Bosseboeuf *et al.*, 2014a). This transcription factor was also detected in isolated type A undifferentiated spermatogonia in rainbow trout (Bellaiche *et al.*, 2014) and in medaka spermatogonia (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2010) suggesting that these spermatogonia have kept their pluripotent character. Finally, Id4, which was described to be expressed in a subpopulation of mice spermatogonia corresponding to SSCs (Oatley *et al.*, 2011), presented an expression pattern extended to all germ cell types in our model. Another example of SSC marker displaying an unexpected large expression pattern in dogfish germ cells is PLZF (Bosseboeuf *et al.*, 2014a). These two factors cannot therefore be used for SSCs identification in *S. canicula*.

Dogfish pSSCs were cultured *in vitro* as described in Gautier *et al.*, and better characterized at a molecular level using germinal and pluripotency markers. Immunocytochemistry highlighted the expression by colony forming spermatogonia of SSEA4, a surface antigen of embryonic stem cells and of SSCs (Kokkinaki *et al.*, 2011), c-Kit, generally described as a marker of differentiated spermatogonia but also expressed in gonocytes and in pSSCs, for example in dogfish and mice (Izadyar *et al.*, 2008; Loppion *et al.*, 2008), Nanos1A and Nanos1B, zinc-finger proteins expressed in all germ cells and in dividing spermatogonia respectively in dogfish (unpublished personal data). But these factors were expressed by several subpopulations of spermatogonia in culture. GFR α 1 and Nanos1B had a larger distribution in germ cells compared to SSEA4, which was, in turn, expressed in more spermatogonia than Pou2. The different markers selected indeed correspond to different spermatogonial subpopulations including pSSCs, various progenitors and spermatogonia in differentiation. In tilapia, like in dogfish, GFR α 1 is a marker of several undifferentiated spermatogonia types and broadly distributed in spermatogonial colonies (Santos Nassif Lacerda *et al.*, 2013; Bosseboeuf *et al.*, 2014a). In accordance with our observations, in cat, the SSEA4/GFR α 1-double labeling of mixed germ cells revealed that most labeled cells were GFR α 1⁺ only, double labeled cells represented around 1/10 of labeled cells and SSEA4⁺ only cells were rare (Powell *et al.*, 2016). Concerning the pluripotency factor Pou2/Oct4, our results are in contradiction with those obtained in human testis, where SSEA4⁺ cells represented only a subpopulation of Oct-4⁺ cells located at the basement membrane of the

seminiferous tubules (Izadyar *et al.*, 2011). Colonies formed by pSSC *in vitro* seems therefore composed of both, SSC and undifferentiated spermatogonia. Finally, high telomerase activity was detected in *S. canicula* spermatogonial culture, a characteristic of spermatogonial stem cells which has been described as crucial for the male germline stem cell maintenance in mice (Pech *et al.*, 2015). Taken together, *in vitro* assays revealed that the dogfish spermatogonial culture, enriched in undifferentiated spermatogonia coming from the germinative area, includes several spermatogonial subpopulations with stemness features.

A second objective of this work was to establish a protocol of pSSCs transplantation in dogfish, in order to demonstrate *in vivo* the stemness of the cultivated spermatogonia. Transplantation technique has been well described in different models including mice, Nile tilapia or zebrafish (Brinster and Avarbock, 1994; Nobrêga *et al.*, 2010; Santos Nassif Lacerda *et al.*, 2013), but no spermatogonial transplantation has been carried out on Chondrichthyes and many adjustments were necessary. Prior the transplantation, cells have to be labelled in order to be followed in the recipient. Numerous studies used GFP reporter constructions where the GFP gene is driven by germ cell specific regulatory regions such as the promoter of *vasa* gene (Okutsu *et al.*, 2006b), but transgenesis is not a tool available in the little shark *S. canicula* yet. Cells were therefore labelled with the PKH26 membrane dye, a marker commonly used to trace SSCs after transplantation in teleost fish such as in the Nibe croaker or in the yellow tail (Takeuchi *et al.*, 2009; Morita *et al.*, 2015). However, the specific osmolarity of Chondrichthyes internal environment was not compatible with the PKH26 manufacturer protocol. Commonly, cells are previously suspended in the diluent C that facilitates PKH26 integration in cell membrane. However, this solution is adapted to mammals or teleostean fish that have an internal osmolarity around 300 mOs but not for Chondrichthyes whose osmolarity is about 900 mOs. Thereby, when pSSCs of *S. canicula* were in contact with diluent C cells suffered of a hypotonic choc. To rescue survival cells, PKH26 labelled cells were then put in culture in Gautron medium enriched in serum and recombinant GDNF. After one week, we observed the formation of several colonies of pSSCs on a somatic cells layer, both labelled with PKH26 and presenting a cell viability of 83%.

In the literature, transplanted cells can be injected by different ways, the urogenital pore of mature recipient (Lacerda *et al.*, 2010; Nobréga *et al.*, 2010), directly in the gonad of adult recipients (Qin *et al.*, 2016), or in the intraperitoneal cavity of hatched larvae (Farlora *et al.*, 2014). In Nile Tilapia or zebrafish, the testis is directly connected to the urogenital pore by the spermatic duct (Lacerda *et al.*, 2010; Menke *et al.*, 2011) but in dogfish, the complex genital tract does not allow transplantation by the urogenital pore. In *S. canicula*, the urogenital pore is indeed linked to seminal vesicles connected to the deferent ducts, themselves connected to a long epididymis linked to the testes by the efferent ducts (Brien, 1958). Thereby, preliminary transplantation tests in juveniles by injection of methylene blue solution through the urogenital papilla revealed that the solution injected did not go further than the cloaca (data not shown). Otherwise, the injection of pSSCs directly in adult or juvenile gonads is relatively complicated because it could implicate a surgical intervention to reach the gonad and would require the depletion of endogenous germ cells. We have therefore favored transplantation in embryo coelomic cavity. In the little spotted dogfish, embryos development occurs in a rigid eggshell that protects them. The eggshell should therefore be removed to allow an access to the embryo for transplantation. The first approaches have consisted in completely extracting the embryo from its capsule. However, at stage 27, embryonic yolk membrane is very fragile, so the fact of removing the embryo from its eggshell induced the rupture of the yolk membrane. Yolk explosion occurred during the transfer in a square watch glass or after this transfer, even when paraffin was added to apply a slight pressure on the yolk membrane, this led to the embryo death in the three next days. Finally, transplantation was performed directly in the embryo eggshell by removing just a little part of this shell and the results obtained appeared promising. Embryos were maintained up to 15 days in sterile seawater after injection, which should allow the observation of the gonadal colonization and SSC proliferation. Controls embryos, which were not injected but whose eggshell was opened, survived one month in sterile seawater. So, an improvement of the injection technique by repeated experiments could double the time of analysis after injection. In this case, it would even be possible to test the plasticity of dogfish germ cells as a sexual dimorphism should be detectable with germ cells in

the gonadal cortex in females and germ cells in the medulla in males. This survival of one month after the eggshell opening remains a relatively short time, knowing that the embryo is at term at stage 34, about four months after transplantation (Ballard *et al.*, 1993). We therefore hypothesize that embryo death can be due to the parafilm package, even if this new method considerably improved the survival post-injection compared to the embryo isolation in a watch glass. The shell of *S. canicula* embryos is rigid but is permeable to ions and small molecules in order to regulate embryo homeostasis. The shell allows the internal jelly to have the same osmolarity as the sea water in which the embryo evolves (Kormanik, 1993). Parafilm could form an impermeable barrier which perturbs osmolarity regulation and so may explain the death of the embryos one month after the opening of the shell. So, several key steps of the SSCs transplantation protocol were defined for the first time in a Chondrichthyes species. To conclude, *in vitro* cultured spermatogonial stem cells have been better characterized in dogfish and key steps of a transplantation protocol were defined. These results open the way to new techniques in the safeguarding of many endangered cartilaginous fish.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This research was supported by the “Conseil Régional de Basse-Normandie” and “Fonds Européen de Développement Régional” (PEPTISAN project certified by the competitiveness cluster “Pole Mer Bretagne”). Laura Gribouval PhD studies are supported by ANRT and Kelia (CIFRE grant).

Acknowledgements

The authors are grateful to Mr Faliguerho and Mr Lequenne of the “Lycée Maritime et Aquacole de Cherbourg” (France) for capturing the dogfish specimens, the aquarium “La Cité de la mer” staff and particularly Mr Faure, Mr Bouis and Mr Cauvin (Cherbourg, France) and Mr Guyon of the “Centre de Recherches en Environnement Côtier” (Luc sur mer, France) for the care given to the dogfish. Finally, the authors also thank Ms Adeline for her precious advices in histology.

References :

- Altman E, Yango P, Moustafa R, Smith JF, Klatsky PC and Tran ND** (2014) Characterization of human spermatogonial stem cell markers in fetal, pediatric, and adult testicular tissues. *Reproduction* **148** 417–427.
- Ballard WW, Mellinger J and Lechenault H** (1993) A Series of Normal Stages for Development of *Scyliorhinus canicula*, the Lesser Spotted Dogfish (Chondrichthyes : Scyliorhinidae). *The Journal of Experimental Zoology* **336** 318–336.
- Bellaïche J, Lareyre J, Cauty C, Yano A, Allemand I and Gac F Le** (2014) Spermatogonial Stem Cell Quest : nanos2 , Marker of a Subpopulation of Undifferentiated A Spermatogonia in Trout Testis 1. *Biology of Reproduction* **90** 1–14.
- Bosseboeuf A, Gautier A, Auvray P, Mazan S, Sourdain P and Curie-paris PM** (2014) Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L .). *Reproduction Research* **147** 125–139.
- Brien P** (1958) *Guide de Travaux Pratiques de Zoologie*. Masson Paris, pp 195-211.
- Brinster RL and Avarbock MR** (1994) Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91** 11303–11307.
- Chen S-R and Liu Y-X** (2015) Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction* **149** R159–R167.
- Chiarini-Garcia H and Russell LD** (2002) Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction* **123** 567–577.
- Dulvy NK, Fowler SL, Musick JA, Cavanagh RD, Kyne M, Harrison LR, Carlson JK, Davidson LNK and Sonja V** (2014) Extinction risk and conservation of the world ’ s sharks and rays. *eLife* 1–34.
- Farlora R, Hattori-Ihara S, Takeuchi Y, Hayashi M, Octavera A, Alimuddin and Yoshizaki G** (2014) Intraperitoneal Germ Cell Transplantation in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Biotechnology* **16** 309–320.
- Froschauer A, Khatun MM, Sprott D, Franz A, Rieger C, Pfennig F and Gutzeit HO** (2013) oct4 -EGFP reporter gene expression marks the stem cells in embryonic development and in adult gonads of transgenic medaka. *Molecular Reproduction and Development* **80** 48–58.

- Gautier A, Bosseboeuf A, Auvray P and Sourdain P** (2014) Maintenance of Potential Spermatogonial Stem Cells In Vitro by GDNF Treatment in a Chondrichthyan Model (*Scyliorhinus canicula* L .) 1. *Biology* **91** 1–15.
- He Z, Jiang J, Hofmann M-C and Dym M** (2007) Gfra1 Silencing in Mouse Spermatogonial Stem Cells Results in Their Differentiation Via the Inactivation of RET Tyrosine Kinase1. *Biology of Reproduction* **77** 723–733.
- Hermann BP, Sukhwani M, Hansel MC and Orwig KE** (2010) Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reproduction* **139** 479–493.
- Izadyar F, Wong J, Maki C, Pacchiarotti J, Ramos T, Howerton K, Yuen C, Greilach S, Zhao HH, Chow M et al.** (2011) Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Human Reproduction* **26** 1296–1306.
- Kokkinaki M, Djourabtchi A and Golestaneh N** (2011) Long-term Culture of Human SSEA-4 Positive Spermatogonial Stem Cells (SSCs). *Journal of Stem Cell Research & Therapy* **1**.
- Kormanik GA** (1993) Ionic and osmotic environment of developing elasmobranch embryos. *Environmental Biology of Fishes* **38** 233–240.
- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Costa GMJ, Segatelli TM, Quirino BR, Queiroz BM, Kalapothakis E and França LR** (2010) A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish : The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. *PLoS ONE* **5** 1–9.
- Lacerda SMSN, Costa GMJ, Campos-Junior PHA, Segatelli TM, Yazawa R, Takeuchi Y, Morita T, Yoshizaki G and França LR** (2013) Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry* **39** 3–11.
- Leal MC, Cardoso ER, Nobrega RH, Batlouni SR, Bogerd J, França LR and Schulz RW** (2009) Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations 1. *Biology of Reproduction* **81** 177–187.
- Lee S, Seki S, Katayama N and Yoshizaki G** (2015) Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. *Scientific Reports* **5** 16045.
- Lim JJ, Seol DW, Choi KH, Shin DH, Kim HJ, Song S and Lee DR** (2014) Spermatogonial stem cell enrichment using simple grafting of testis and in vitro cultivation. *Scientific Reports* **4** 1–10.
- Loir M and Sourdain P** (1994) *Testes Cells : Isolation and Culture*.
- Loppion G, Crespel A, Martinez A, Auvray P and Sourdain P** (2008) Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis , *Scyliorhinus canicula* L . *Cell and Tissue Research* 533–542.
- Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM and Woutersen RA** (2011) Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology* **39** 759–775.
- Morita T, Morishima K, Miwa M, Kumakura N, Kudo S, Ichida K, Mitsuboshi T, Takeuchi Y and Yoshizaki G** (2015) Functional Sperm of the Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) Were Produced in the Small-Bodied Surrogate, Jack Mackerel (*Trachurus japonicus*). *Marine Biotechnology* **17** 644–654.
- Nobréga RH, Greebe CD, Van De Kant H, Bogerd J, Renato de França L and Schulz RW** (2010) Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish.

- Oatley MJ, Kaucher A V, Racicot KE and Oatley JM** (2011) Inhibitor of DNA Binding 4 Is Expressed Selectively by Single Spermatogonia in the Male Germline and Regulates the Self-Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Mice 1. *Biology of Reproduction* **85** 347–356.
- Okutsu T, Yano A, Nagasawa K, Shikina S, Kobayashi T, Takeuchi Y and Yoshizaki G** (2006) Manipulation of Fish Germ Cell: Visualization, Cryopreservation and Transplantation. *Journal of Reproduction and Development* **52** 685–693.
- Pech MF, Garbuzov A, Hasegawa K, Sukhwani M, Zhang RJ, Benayoun BA, Brockman SA, Lin S, Brunet A, Orwig KE et al.** (2015) High telomerase is a hallmark of undifferentiated spermatogonia and is required for maintenance of male germline stem cells. *Genes and Development* **29** 2420–2434.
- Potter SJ and DeFalco T** (2017) Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction* **153** R151–R162.
- Qin Y, Liu L, He Y, Wang C, Liang M, Chen X, Hao H, Qin T, Zhao X and Wang D** (2016) Testicular Busulfan Injection in Mice to Prepare Recipients for Spermatogonial Stem Cell Transplantation Is Safe and Non-Toxic. *PLOS ONE* **11** e0148388.
- Saga Y** (2010) Function of Nanos2 in the male germ cell lineage in mice. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67** 3815–3822.
- Santos Nassif Lacerda SM, Costa GMJ, da Silva M de A, Almeida Campos-Junior PH, Segatelli TM, Peixoto MTD, Resende RR and de França LR** (2013) Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *General and Comparative Endocrinology* **192** 95–106.
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR and Godinho HP** (2005) Sertoli cell proliferation in the adult testis--evidence from two fish species belonging to different orders. *Biology of Reproduction* **73** 891–898.
- Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Miwa M and Yoshizaki G** (2009) Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biology of Reproduction* **81** 1055–1063.

Figure legends

Figure 1 : Identification of new stem cells markers expressed by dogfish pSSCs.

Sox 2 (A to D), SSEA4 (A' to D') and Id4 (A'' to D'') proteins were localized by immunohistochemistry on 3 µm-thick transversal sections of dogfish testis using HRP conjugated antibodies and 3, 3'-diaminobenzidine revelation. Sox2 was detected in potential Spermatogonial Stem Cells (pSSC) in the germinal niche or zone A0 (A,a), in undifferentiated spermatogonia forming cysts (B) and at a lower level in differentiated spermatogonia (C) in zone A-, no expression was detected in spermatocytes (D) and at later stages. SSEA4 showed a more restricted expression pattern limited to pSSCs, undifferentiated spermatogonia leaving the niche (A', a'), and a low expression in the first cysts in zone A- (B'). No expression was detected thereafter (C', D'). In contrast, Id4 showed a large distribution in germ cells at all stages (A''-D''). As expected, no signal was detected in the controls using the secondary antibodies only, HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody for SSEA4 (E) and anti-rabbit IgG antibody for the two others markers (F). Immunohistochemistry was performed in triplicate. pSSC : potential spermatogonial stem cell, Spg : spermatogonia, SN : Sertoli cell nucleus, L : lumen, Spc : spermatocyte.

Figure 2 : Dogfish pSSCs culture contains several subpopulations of undifferentiated spermatogonia.

Co-immunocytochemistry (ICC) was performed on dogfish pSSCs after one week culture using SSEA4 and other germinal or pluripotency markers. ICCs were analyzed using fluorescence confocal (A) or photonic (B) microscopy. Nuclei were labeled with DAPI. SSEA4 showed a more restricted expression pattern compared to GFRα1 and Nanos1B, a similar expression pattern than c-Kit and Nanos1A and a larger distribution than POU2. SSEA4/ GFRα1 and POU2 immunohistochemistry were performed in triplicate. SSEA4/ Nanos1A, Nanos1B and c-Kit were performed in duplicate. Scale bars = 40 µm. Telomerase activity was tested by Telomeric Repeat Amplification Protocol on one-week pSSC cultures (C). Telomerase products amplified by PCR were deposited on acrylamide gel for migration. The SSCs

culture showed a high telomerase activity, similar to the breast cancer cell line MCF7 extracts (positive control, +). As expected, heat-treated extracts showed no activity (negative control, -).

Figure 3 : Characterization of dogfish gonadal development for pSSC transplantation.

Dogfish embryos at stage 27 and 31, observed under a binocular loupe, are illustrated respectively in A and B. Histological sections of these embryos illustrate the gonadal ridges first appearance in stage 27 embryo (A, upper panel). The two gonads in formation (g) are located close to the kidney (k) between the chord (c) and the intestine (i), protruding in the coelomic cavity. Immunohistochemistry also highlight the small number of gonocytes in the gonads, revealed by Vasa labeling (A, lower panel). In stage 31 embryo, gonads are more developed (B, upper panel) and Vasa positive germ cells are more numerous (B, lower panel). nt : neural tube, c : chord, m : muscle, k : kidney, i : intestine, g : gonad. The black arrowheads indicate gonocytes.

Figure 4: Scheme of the general procedure for pSSCs transplantation in *S. canicula*.

Testes were removed from male adult mature dogfish and zone A0 containing pSSCs was microdissected in each testis slice. After enzymatic dissociation, cells recovered in Gautron medium supplemented in serum at 17°C overnight. After filtration, a differential plating was performed in order to enrich the culture in spermatogonia, which are less adherent than the somatic cells. Cells were next labelled with PKH26 fluorochrome and cultivated for one week at 17°C. The PKH26 labelled pSSC colonies were then dissociated by addition of EDTA. A window was opened in the eggshell of stage 27 embryos, and cells were microinjected using a glass microcapillary in the coelomic cavity of the embryos. Methylene blue was added to the cell preparation to follow the diffusion of the injected solution in the body cavity. After pSSCs transplantation, the eggshell was closed using parafilm and embryos were observed in fluorescence the next days.

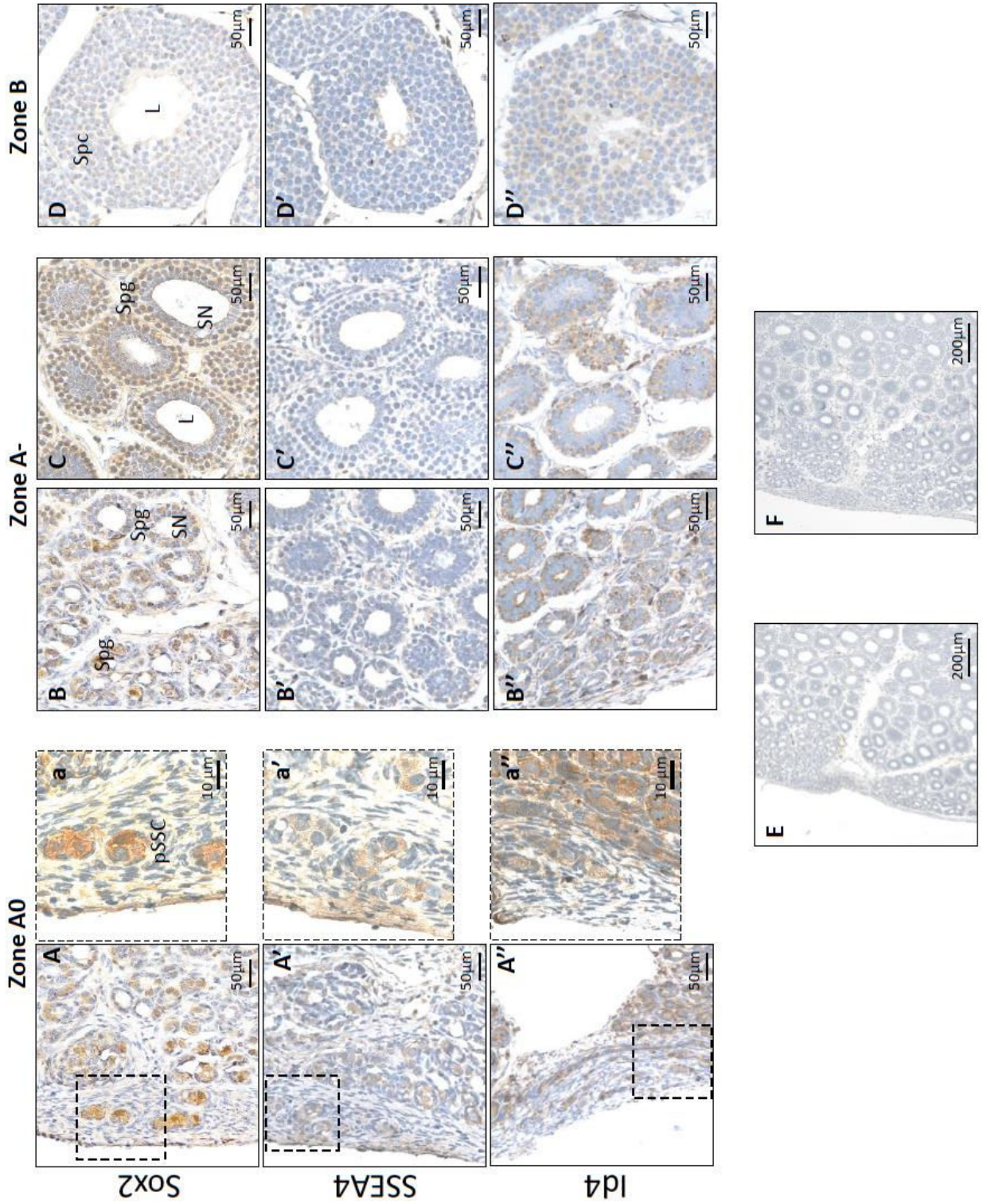


Figure 1

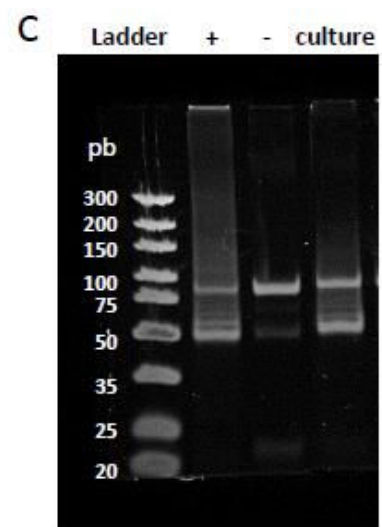
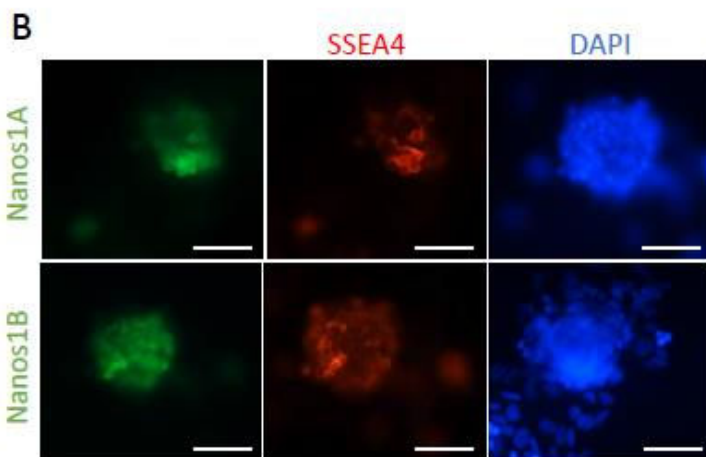
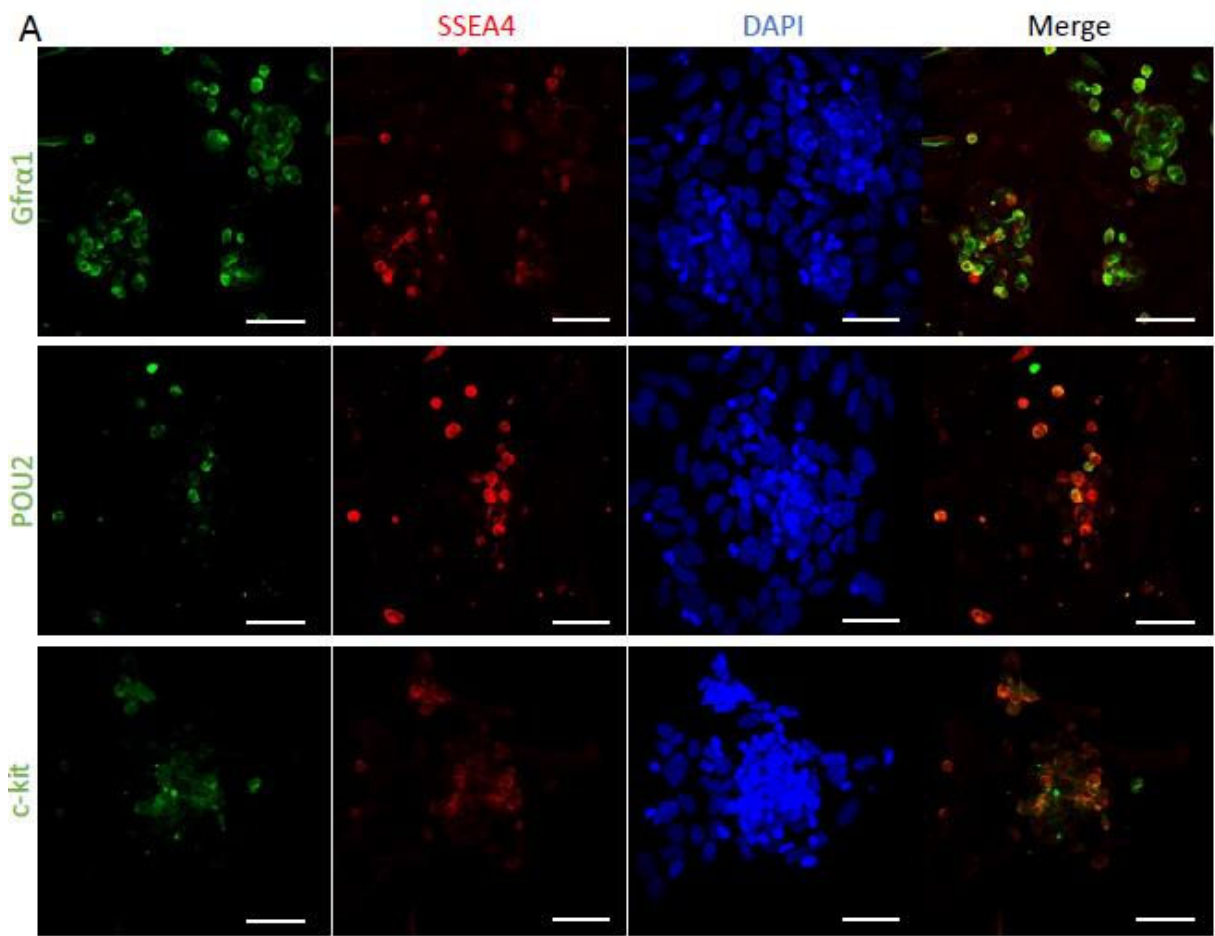


Figure 2

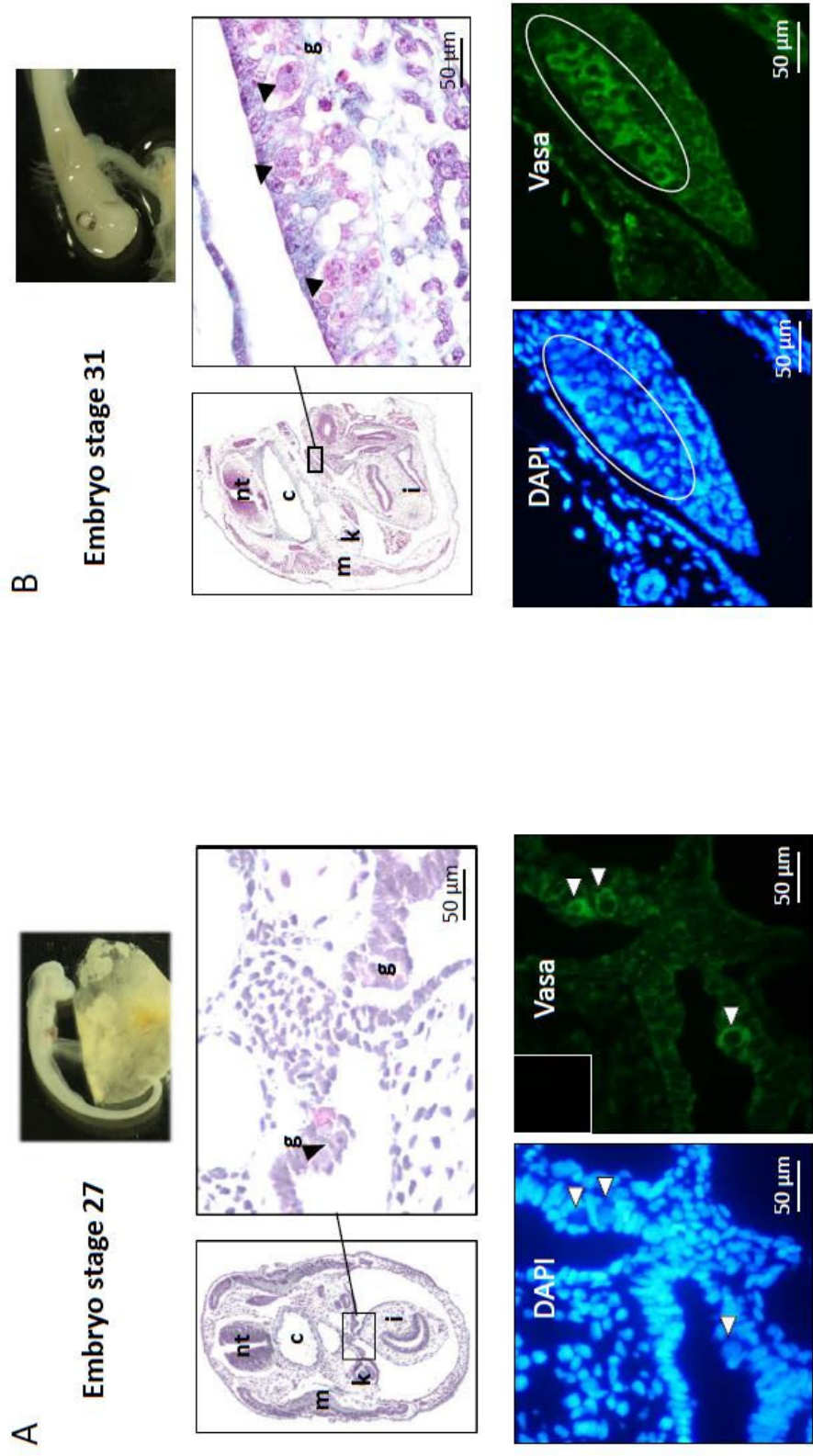


Figure 3

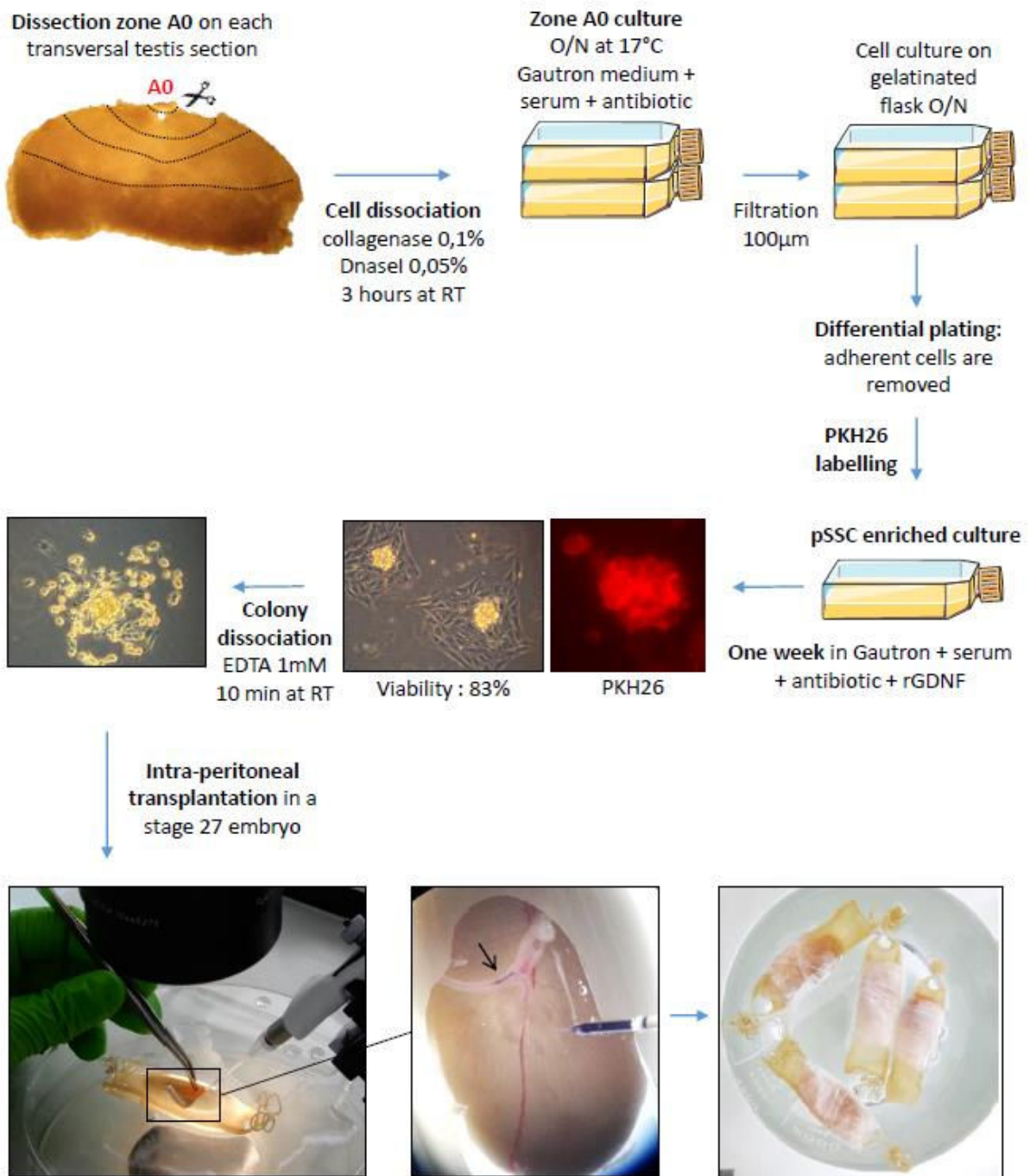


Figure 4

Chapitre 3

CHAPITRE 3

Etude de la chimiokine SDF-1 et de son récepteur CXCR4 dans le testicule de petite roussette

Introduction

Les expériences de transplantation nous ont conduit à nous intéresser aux signaux impliqués dans la migration des SSCs transplantées et des PGCs endogènes jusqu'au primordium gonadique du receveur et dans le « homing » des SSCs dans la niche testiculaire. L'implication dans ces deux mécanismes du couple ligand/récepteur SDF-1, Stromal cell-Derived Factor 1 (aussi nommé CXCL12) /CXCR4, un récepteur couplé aux protéines G, a été démontrée chez divers Vertébrés. La chimiokine SDF-1 sécrétée par les cellules somatiques des crêtes génitales, guide la migration des PGCs, exprimant CXCR4, pour la colonisation des gonades chez le poisson-zèbre, la souris, le poulet et le xénope notamment (Doitsidou *et al.*, 2002 ; Ara *et al.*, 2003 ; Molyneaux *et al.*, 2003 ; Stebler *et al.*, 2004 ; Takeuchi *et al.*, 2010). Plus récemment, il a été montré chez la souris que SDF-1 était exprimé à la base des tubules séminifères par les cellules de Sertoli et contribuait au « homing » des SSCs exprimant CXCR4 dans la niche (Yang *et al.*, 2013). Cette signalisation est aussi importante pour le développement des colonies de SSCs *in vitro* (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2012) et la colonisation des gonades par des SSCs transplantées (Niu *et al.*, 2016). En parallèle des mises au point concernant la transplantation des SSCs chez la petite roussette, nous avons donc initié la caractérisation de ce couple SDF-1/CXCR4 dans notre modèle. Une approche *in silico* a permis d'identifier deux séquences *sdf1* dans le testicule de petite roussette dont une possède un domaine transmembranaire. Par immunohistochimie, SDF-1 a été localisé au sein de la niche germinale dans les cellules somatiques ainsi que dans le compartiment interstitiel testiculaire tandis que son récepteur CXCR4 est exprimé dans les cellules germinales. Ces profils d'expression ont été retrouvés dans les cultures *in vitro* de SSCs mais restent à explorer chez l'embryon.

Matériel et méthodes

Identification et alignement des séquences *in silico*

Les séquences SDF-1 et CXCR4 ont été identifiées chez la petite roussette en utilisant l'algorithme TBLASTN et les séquences protéiques SDF-1 et de CXCR4 de souris comme requête. Quatre banques transcriptomiques de roussette ont été interrogées : une banque réunissant les transcriptomes d'embryons, de juvéniles et de tissus adultes (Redon *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2013), des banques d'ovaire, de zone germinative testiculaire, du reste du testicule (ANR Phylofish, coordonnée par J. Bobe et Y. Guiguen). Les séquences SDF-1 de diverses espèces de Vertébrés, disponibles sur NCBI et SkateBase, ont été alignées à l'aide du logiciel BioEdit ClustalW multiple alignment editor software version 7.1.3.0. La recherche de domaines de structure protéique a été faite avec le logiciel en ligne SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Les identifiants des séquences avec domaine transmembranaire sont *Rhincodon typus* XP_020373863.1 et *Leucoraja erinacea* MGID110360 est5929 ; et sans domaine transmembranaire : *Rhincodon typus* XP_020373862.1 ; *Callorhinchus milii* AFK11434.1 et XP_007897241.1; *Danio rerio* NP_840092.1; *Oryzias latipes* NP_001098197.1; *Salmo salar* NP_001134259.1; *Oncorhynchus mykiss* NP_001268283.1 ; *Latimeria chalumnae* XP_006009497.1 ; *Xenopus laevis* NP_001165249.1 ; *Gallus gallus* NP_989841.1 ; *Equus caballus* AHK25457.1 et *Homo sapiens* P48061.1.

Animaux

Les petites roussettes *Scyliorhinus canicula* mâles ont été capturées dans la Manche par le lycée Maritime et Aquacole de Cherbourg. L'aquarium La Cité de la Mer (Cherbourg) a dans un premier temps stocké les animaux dans des bassins d'eau de mer naturelle en attendant leur transfert au Centre de Recherches en Environnement Côtier (Luc sur Mer, France). Les roussettes ont alors été acclimatées pour au moins deux semaines avant d'être utilisées pour des prélèvements. Elles ont alors été tuées par commotion cérébrale puis section de la moelle épinière et enfin démyélinisation. Toutes les procédures ont été réalisées en accord avec la directive européenne 2010/63/UE pour l'utilisation et le soin aux animaux. Tout le personnel est qualifié et entraîné pour l'expérimentation animale. Les testicules prélevés ont directement été transférés dans du milieu Gautron (Loir and Sourdain, 1994a) complété avec 58 mM triméthylamine-N-oxyde (TMAO) puis ils ont été coupés en sections transversales de 1 cm d'épaisseur. Chaque section est par la suite déshydratée par des bains successifs d'éthanol (25%, 50%, 75% et 100% dans du PBS) puis fixée dans du PFA 4% toute la nuit. Les coupes sont par la suite placées dans du butanol (100%) pendant une nuit et incluses dans de la paraffine.

Culture cellulaire

La culture cellulaire a été établie selon le protocole de Gautier et al. 2014. Une fois prélevés, les testicules sont disséqués. Dans un premier, l'albuginée est retirée et les testicules sont coupés en tranches de 2 mm d'épaisseur sur toute leur longueur. Chaque coupe est par la suite disséquée afin de récupérer seulement la zone A0, localisée au-dessus du vaisseau sanguin, et qui contient les cellules souches spermatogoniales. Les échantillons sont collectés puis dissociés mécaniquement avec des ciseaux fins dans 3ml de milieu Gautron contenant

0.1 % de collagénase et 0.05% de DNase1. La dissociation enzymatique se poursuit sous agitation dans 10ml de milieu de dissociation pendant 3 heures. Une fois dissociées les cellules sont récupérées, rincées dans du milieu Gautron et mises en culture dans le même milieu supplémenté en sérum (1% FBS, 0.5% BSA et 2% de sérum de roussette décomplémenté) à 17°C pendant toute une nuit. Les cellules sont alors récupérées et filtrées sur une toile dont le maillage est de 100 µm. Un « differential plating » est réalisé pour enrichir la culture en spermatogonies, en récupérant le surnageant seulement après une nuit de culture dans une flasque gélatinée à 17°C. Le tapis de cellules somatiques est éliminé. Le surnageant est centrifugé à 300g pendant 2min et mis en culture dans du milieu Gautron complémenté avec des antibiotiques et du sérum (1% FBS, 0.5% BSA, 0.25% de sérum de roussette décomplémenté) supplémenté de milieu L15 (20Mm Hepes, 1% FBS, 0.5% BSA, 0.25 % sérum de roussette décomplémenté, 58 mM TMAO, 330 mM Urée, 280 mM NaCl, 4.6 mM Dextrose) (v/v : 1/1) dans un support gélatiné pendant une semaine.

Immunohistochimie

Les testicules inclus dans la paraffine ont été coupé au microtome et les coupes obtenues ont été déposées sur des lames polylysées. Des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été déparaffinées par des bains de Roti®-Histol et réhydratées dans des séries de bains d'éthanol à différentes concentrations. Le démasquage des sites antigéniques a été réalisé par un chauffage au micro-ondes puis un refroidissement lent d'une heure à température ambiante. L'activité des peroxydases endogènes a été bloquée par un bain de 30 min dans une solution de 3% H₂O₂/PBS et la saturation des sites aspécifiques a été réalisée par un bain de 30min dans une solution 1% BSA (w/v) /triton 0.1% (v/v) /PBS. Deux anticorps hétérologues ont été

utilisés comme anticorps primaire CXCR4 (1/50, anticorps monoclonal de rat anti-CXCR4 de souris, MAB21651, R&D Systems) et SDF-1 (1/150, anticorps polyclonal de lapin anti-SDF-1 humain, sc-28876, Santa Cruz). Tous les deux ont été dilués dans la solution de blocage et incubés toute la nuit à 4°C. Les coupes ont été rincées et incubées pendant 2h à température ambiante avec un anticorps secondaire polyclonal anti-IgG de lapin conjugué HRP (1/200, hôte porc, 31430, ThermoScientific) ou un anticorps anti-IgG de rat conjugué HRP (1/200, hôte âne, 712-035-150, Jackson ImmunoResearch). La révélation a été réalisée avec la diaminobenzidine (DAB) jusqu'à ce que la coloration soit observable. Les images ont été acquises grâce au microscope Eclipse 80i équipé avec le logiciel NIS-Elements D 3.0 (Nikon instruments, Japan).

Immunocytochimie

Des colonies de spermatogonies souches potentielles sont visibles après une semaine sur des lames compartimentées pour culture (354114, Falcon) dans du milieu Gautron supplémenté avec du milieu L15 (v/v :1/1) et du GDNF 10 ng/ml (Gautier *et al.*, 2014). Les cellules ont été fixées au PFA 4% /PBS pendant 15 min à température ambiante. Après deux rinçages de 5 min au PBS /BSA 1% /triton 0.05% à 4°C, les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires anti-SSEA4 (1/100, anticorps monoclonal de souris anti-SSEA4 humain, ab16287, Abcam), anti-CXCR4 (1/200, anticorps monoclonal de rat anti-CXCR4 de souris, MAB21651, R&D Systems) et anti-SDF-1 (1/50, anticorps polyclonal de lapin anti-SDF-1 humain, sc-28876, Santa Cruz) dilués dans du PBS BSA 1%, pendant une heure dans une chambre humide à température ambiante. Après un rinçage de 5 min au PBS BSA 1%, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes : anti-IgG de lapin conjugué Alexa 488 (1/200, hôte chèvre, A11008, Life Technologies), anti-IgG de rat conjugué Rhodamine (1/200, hôte chèvre, 112-025-003, Jackson ImmunoResearch) et anti-IgG de souris conjugué Alexa 488

(1/200, hôte chèvre, A11001, Life Technologies) dilués dans du PBS BSA 1 %, pendant 30min dans une chambre humide à température ambiante. Après plusieurs rinçages, le montage a été réalisé avec un milieu contenant du DAPI (P36931, ThermoFisher Scientific). Les images ont été acquises grâce à un microscope confocal (olympus FV1000) équipé avec le logiciel Olympus FluoView 4.2.

Résultats

Identification du récepteur CXCR4 et de deux séquences SDF-1 chez la petite roussette *S. canicula*.

La recherche des séquences de CXCR4 et de SDF-1 chez la petite roussette *S. canicula* a été réalisée par blast sur des banques transcriptomiques d'ovaire, de testicule et de divers tissus adultes et d'embryons. Cette analyse *in silico* a permis d'identifier un transcrite du récepteur CXCR4 chez la petite roussette (Figure 25A). L'analyse de la séquence a montré la présence de 7 domaines transmembranaires caractéristiques de la famille de récepteurs couplés aux protéines G (Figure 25A, en bleu). Concernant la chimiokine SDF-1, deux séquences ont été identifiées chez la petite roussette. Une des séquences possède un domaine transmembranaire (Figure 25B, encadré rouge) et a été identifiée dans les banques transcriptomiques d'ovaire, de testicule et dans une banque regroupant différents tissus adultes et d'embryons alors qu'une séquence sans domaine transmembranaire a été identifiée dans cette même banque ainsi que dans une banque réalisée à partir de la niche testiculaire. Les deux séquences comprennent les quatre cystéines conservées caractéristiques des ligands de la famille CXCL (Figure 25B, astérisques). La séquence avec domaine transmembranaire n'ayant pas été décrite précédemment, elle a été recherchée

chez les autres Chondrichthyens et retrouvée chez deux autres Elasmobranches, le requin-baleine (*Rhincodon typus*) et la raie hérisson (*Leucoraja erinecea*), mais pas chez la chimère (*Callorhinchus milii*).

Une expression somatique de SDF-1 et germinale de CXCR4 dans le testicule de roussette.

SDF-1 et son récepteur CXCR4 ont été localisés par immunohistochimie sur des coupes de testicule de petite roussette adulte avec des anticorps hétérologues. La chimiokine SDF-1 est fortement exprimée dans la niche germinale au niveau des cellules somatiques ainsi que dans le reste du testicule dans les cellules du compartiment interstitiel et les cellules péricystiques (Figure 26A). L'anticorps polyclonal utilisé a été généré contre la protéine humaine entière, ce qui ne permet pas de savoir quelle forme de SDF-1 est détectée. On peut également souligner que SDF-1 n'est pas retrouvé au sein des cystes ou des spermatogonies de la niche, ni dans les canalicules connectés aux cystes. Les résultats préliminaires obtenus avec l'anticorps anti-CXCR4 montrent que ce récepteur est fortement exprimé par les SSCs potentielles de la niche puis cette expression germinale diminue au cours de la différenciation des spermatogonies, même si un bruit de fond persiste sur nos coupes (Figure 26B). Un marquage des érythrocytes est également observé.

L'expression de SDF-1 et CXCR4 est conservée *in vitro*

Ces deux facteurs étant exprimés dans la niche, nous avons étudié leur expression dans les cultures primaires établies à partir de la zone A0 de testicule de petite roussette. Il s'agit de co-cultures enrichies par « differential plating » en SSCs potentielles. Ces cultures sont caractérisées par la présence d'un tapis de cellules somatiques qui correspondent aux fibroblastes du tissu conjonctif, aux précurseurs des cellules somatiques et aux cellules de

Sertoli. Ce sont probablement ces dernières qui forment une assise pavimenteuse de soutien aux colonies. A l'aide d'un marquage au DAPI, elles se distinguent des cellules germinales par leurs larges noyaux aplatis peu intenses en fluorescence. L'immunocytochimie réalisée sur ces cultures de SSCs a révélé que le récepteur CXCR4 était co-localisé avec SSEA4, un marqueur de cellules souches spermatogoniales, dans les spermatogonies indifférenciées en culture. Comme attendu, les cellules somatiques n'expriment pas CXCR4 (Figure 27A). SDF-1 est exprimé dans les cellules somatiques qui tapissent le fond des cultures, y compris celles situées sous les colonies. SDF-1 n'est pas exprimé par les cellules germinales CXCR4⁺, la fluorescence jaune obtenue dans les colonies par superposition des images est liée à la présence de ces facteurs à des niveaux différents mais superposés.

Discussion

Cette étude préliminaire met en évidence chez la roussette deux séquences SDF-1 qui se différencient l'une de l'autre par la présence d'un domaine transmembranaire. A notre connaissance, il n'a pas été décrit précédemment de forme membranaire de cette chimiokine chez les Vertébrés que ce soit chez les poissons téléostéens ou les Tétrapodes. L'alignement des séquences protéiques de SDF-1 de *S. canicula* avec d'autres espèces de Chondrichthyens a révélé que cette particularité est également retrouvée chez le requin baleine et la raie hérisson mais pas chez la chimère. Ainsi, chez les Elasmobranches, le ligand SDF-1 existe sous deux formes, une forme sécrétée décrite chez les Vertébrés et une forme transmembranaire supplémentaire. Il serait intéressant de rechercher ces deux séquences chez des représentants d'Actinoptérygiens et de Sarcoptérygiens ancestraux tels que le gar et le coelacanthe afin de savoir si cette forme transmembranaire a été perdue au cours de

l'évolution. Notons qu'un autre acteur majeur de la migration des PGCs, kit ligand aussi appelé Stem Cell Factor (SCF), existe sous deux formes, membranaire et sécrétée, générées par épissage alternatif (Flanagan *et al.*, 1991). La forme membranaire de SCF contrôle la survie et la motilité des cellules germinales en concentrant fortement ce facteur localement au sein d'une niche en déplacement, hors de laquelle les cellules germinales meurent par apoptose (Gu *et al.*, 2011). Les deux formes de SDF-1 pourraient agir de même chez la petite roussette, ces deux voies de signalisation seraient-elles alors redondantes chez les Elasmobranches ?

La ou les protéines SDF-1 a/ont été localisé(es) par immunohistochimie dans le tissu interstitiel du testicule depuis la niche jusqu'à la zone D contenant les cystes à spermatides allongées, contrairement à ce qui est décrit chez les Mammifères, où SDF-1 est limité au compartiment basal des tubes séminifères. Son récepteur CXCR4 est fortement exprimé par les spermatogonies indifférenciées, puis cette expression germinale diminue. Ces résultats confortent l'hypothèse que la voie CXCR4/SDF-1 pourrait être impliquée dans le homing et le maintien des cellules souches spermatogoniales chez ce petit requin comme cela a été décrit chez la souris (Yang *et al.*, 2013)(Niu *et al.*, 2016). Cependant l'expression plus large de SDF-1 au niveau de l'interstitiel de la zone à spermatides allongées et au niveau du tissu épigonal, pourrait être lié à ses fonctions associées au système hématopoïétique par exemple chez le poisson zèbre (Lund *et al.* 2014) ou associées à l'angiogenèse de façon générale (Ziegler *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2017). Ces fonctions pourraient prendre en compte les travaux plus anciens de Piferrer et Callard (1992) qui avaient montré un effet inhibiteur du tissu épigonal sur la synthèse de l'ADN des cystes préméiotiques chez *Squalus acanthias* et qui passerait par la circulation sanguine. Il serait intéressant d'étudier les profils d'expression respectifs des deux transcrits de SDF-1 au sein du testicule de roussette. La présence de la forme de SDF-1 avec

un domaine transmembranaire dans le testicule serait plutôt attendue dans la niche germinale où elle pourrait, de par son interaction avec CXCR4, jouer un rôle dans le homing et le maintien des SSCs au sein de la niche. Étonnamment, cette séquence avec domaine transmembranaire n'a pas été identifiée dans le transcriptome de niche testiculaire, mais cela reste à vérifier par PCR en temps réel.

Ainsi, cette étude révèle deux transcrits de SDF-1, une chimiokine sécrétée chez les Vertébrés mais qui présenterait également une forme membranaire chez les Elasmobranches. Ces premiers résultats suggèrent une possible implication de la voie de signalisation CXCR4/SDF-1 dans le « homing » des SSCs dans la niche germinale chez la petite roussette. Enfin, leur expression reste à étudier au cours de la migration germinale chez l'embryon pour évaluer leur possible rôle dans la migration des PGCs chez un Chondrichthyen.

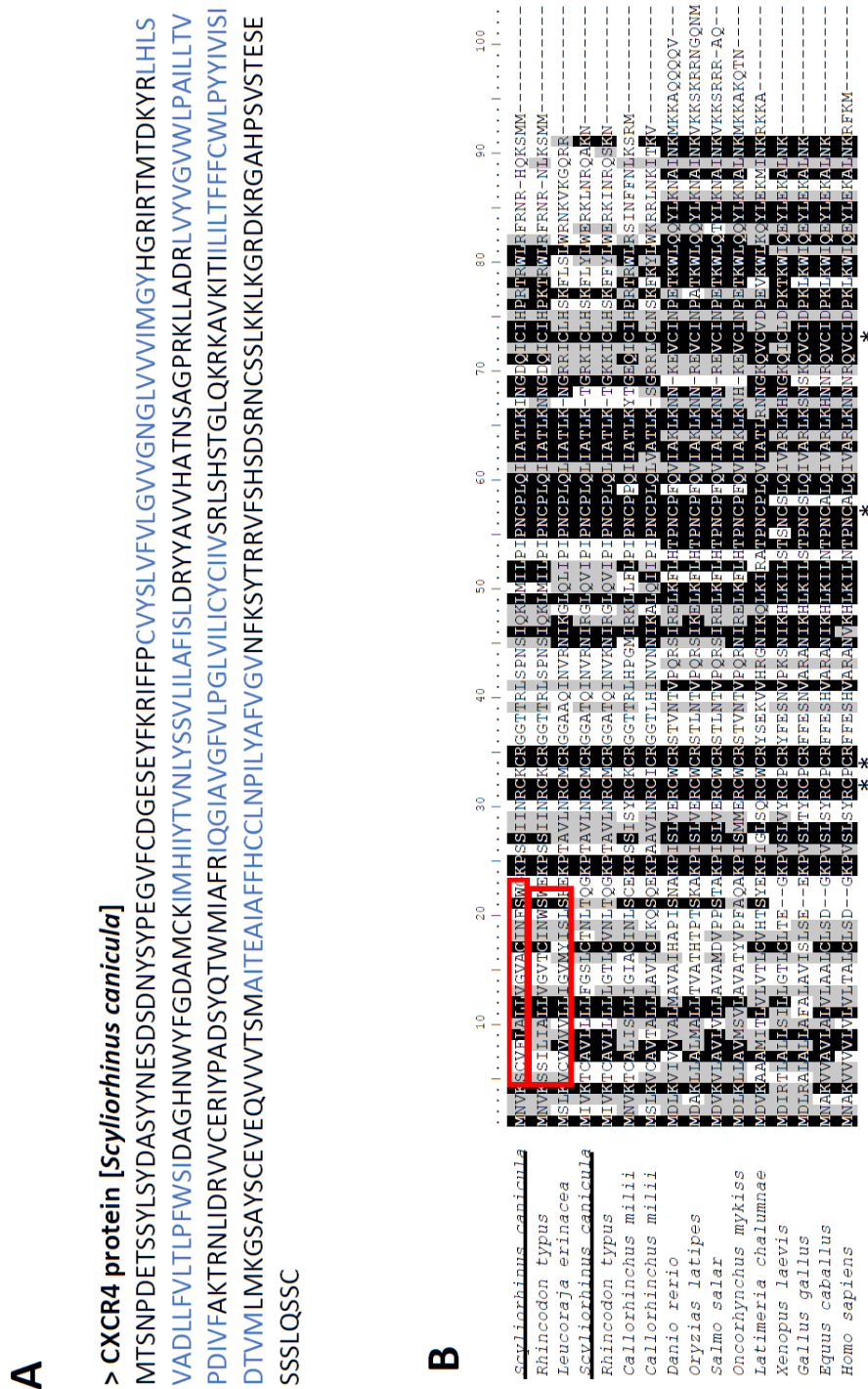


Figure 25 : Identification des séquences CXCR4 et SDF-1 (CXCL12) chez la petite roussette *S. canicula*.

A. Séquence protéique du récepteur couplé à la protéine G, CXCR4, identifié chez la petite roussette, et mise en évidence de ses sept domaines transmembranaire (en bleu) caractéristiques de cette famille de récepteur.

B. Alignement des deux séquences protéiques du ligand SDF-1 identifiées chez la petite roussette (soulignées) avec les séquences SDF-1 d'autres espèces incluant des Chondrichthyens, des poissons téléostéens et des Sarcoptérygiens. L'encadré rouge représente le domaine transmembranaire identifié dans une des séquences de *S. canicula* qui a été également retrouvé chez la raie *L. erinacea* et le requin baleine *R. typus*. Les quatre cystéines conservées caractéristiques des chimiokines CXCL sont indiquées par des astérisques.

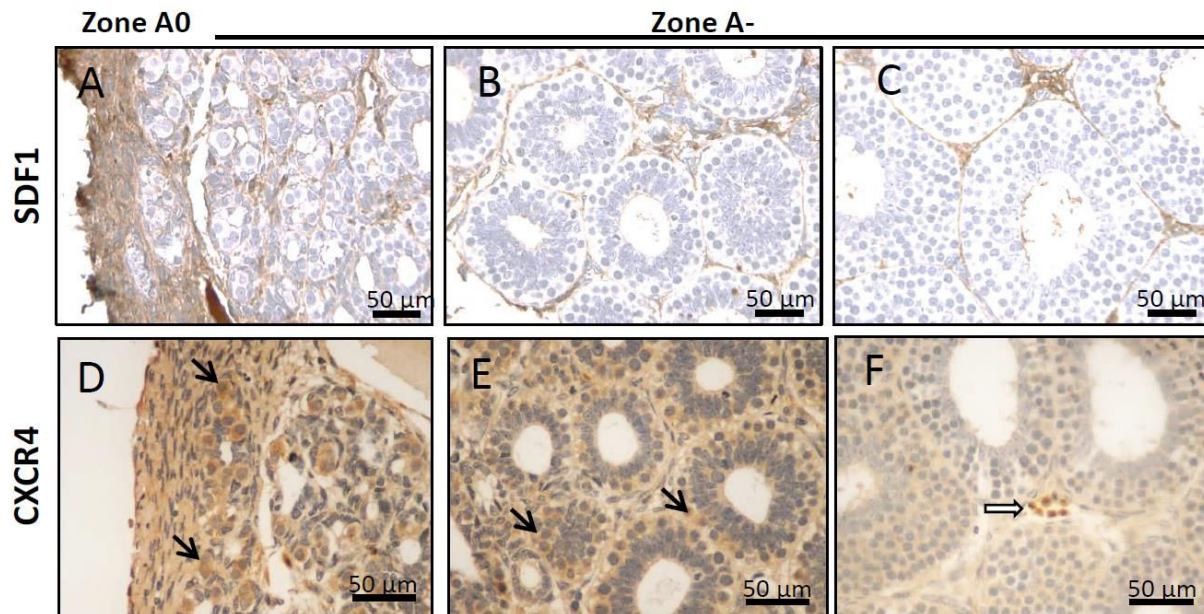


Figure 26 : Immunolocalisation de SDF-1 et CXCR4 dans le testicule de roussette adulte.

Immunolocalisation de SDF-1 par un anticorps polyclonal de lapin anti-SDF-1 humain (Fig. 2A-C) et de CXCR4 par un anticorps monoclonal de rat anti-CXCR4 de souris (Fig. 2D-E). Une contre coloration a été réalisée avec de l'hématoxyline de Groat pour marquer les noyaux en bleu. Les résultats sont présentés pour la zone A0 contenant la niche germinale et les SSCs (Fig. 2A et Fig. 2D) et la zone A- (Fig. 2B-C et Fig. 2E-F) où les spermatogonies s'organisent en cystes. Pour SDF-1, un marquage est observé au niveau de l'interstitiel, notamment au niveau des cellules péricystiques et endothéliales (Insert). Pour CXCR4, un marquage est observé au niveau des spermatogonies (Flèches noires). Un marquage aspécifique des érythrocytes est également observé (Flèche blanche). Les contrôles négatifs ne présentent aucune coloration (non présenté).

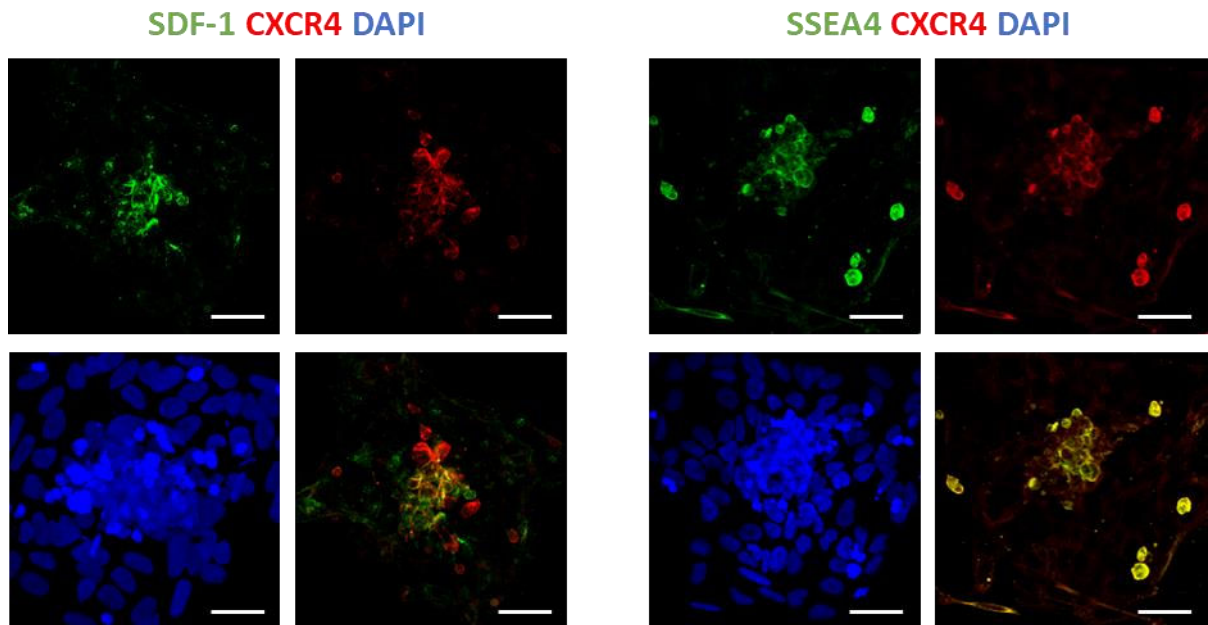


Figure 27: Détection de CXCR4 et SDF-1 dans des cultures de cellules souches spermatogoniales de roussette.

Immunocytochimies réalisées sur des cultures d'une semaine de cellules souches. **A.** Localisation de SDF-1 (vert), CXCR4 (rouge), des noyaux (bleu, DAPI) et superposition des images. **B.** Localisation de SSEA4 (vert), CXCR4 (rouge), des noyaux (bleu, DAPI) et superposition des images. Les barres d'échelle représentent 40 μm .

Chapitre 4

CHAPITRE 4

Shark peptides induce insulin secretion in in vitro and in vivo mammalian model.

Laura GRIBOUVAL ; Elise DESSAUGE ; Cécile GUIARDIERE ; Aude GAUTIER ; Alexandre LEDUC ;
Céline ZATYLNKY-GAUDIN ; Pascal SOURDAINE ; Pierrick AUVRAY

En 2014, le nombre de personnes atteintes d'un diabète de type 2 (T2DM) est estimé à 422 millions et ce chiffre ne cesse d'augmenter (Organisation Mondiale de la Santé). Cette pathologie est caractérisée par une hyperglycémie chronique principalement due à une insulino-résistance, c'est-à-dire une perte de la sensibilité à l'insuline des cellules. De ce fait, les cellules β des îlots de Langerhans (insulino-sécrétrices) du pancréas vont produire davantage d'insuline (hyperinsulinisme) pour répondre à l'hyperglycémie engendrée par l'insulino-résistance jusqu'à ce qu'elles finissent par s'épuiser. La production d'insuline devient alors insuffisante conduisant à une accumulation de glucose dans le sang (hyperglycémie). Autrement dit, l'insuline est produite en quantité insuffisante face à une demande insulinémique importante. Quatre grands groupes d'antidiabétiques ont déjà été caractérisés pour le T2DM : les sécrétalogues de l'insuline, les sensibilisateurs à l'insuline, les inhibiteurs de glucosidase et les incrétines (Bosenberg and Zyl, 2008). Ces différents antidiabétiques vont agir à différents niveaux dans le mécanisme cellulaire de sécrétion de l'insuline, tous induisant une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans et de ce fait diminuant la glycémie des individus.

Récemment, plusieurs peptides d'origine marine ont aussi été identifiés pour leur efficacité dans la gestion du diabète de type 2 (Xia *et al.*, 2017). Chez le saumon (*Oncorhynchus kern*) par exemple, des oligopeptides issus d'hydrolysats de la peau induisent une diminution du glucose sanguin chez des rats diabétiques (Zhu *et al.*, 2010a). La petite roussette *Scyliorhinus canicula* présente, elle aussi, un grand intérêt dans la recherche de peptides à potentiel antidiabétique. En effet, les Chondrichthyens, poissons cartilagineux comprenant les raies, les requins et les chimères, constituent le groupe le plus éloigné des Mammifères possédant une glande pancréatique distincte avec une conservation des caractéristiques moléculaires, cellulaires, hormonales et fonctionnelles (Youson and Al-Mahrouki, 1999). Quatre types cellulaires présents également chez les Mammifères au niveau pancréatique ont été décrits : les cellules α produisant le glucagon, les cellules β synthétisant l'insuline, les cellules δ produisant la somatostatine et les cellules γ à l'origine de du polypeptide pancréatique (Kobayashi and Syed Ali, 1981). De plus, des études ont également confirmé les propriétés hypoglycémiantes de l'insuline chez deux requins (Anderson *et al.*, 2002).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à 6 peptides (Pep14, Pep16, Pep18, Pep20, Pep21 et Pep28) provenant de la petite roussette *Scyliorhinus canicula* afin de tester leur capacité à réguler le métabolisme glucidique de Mammifères. Nous avons testé leur capacité à induire la sécrétion d'insuline *in vitro* sur une lignée de cellules β pancréatiques de rat (RIN5F) et *in vivo* sur des souris ayant un diabète induit par traitement à la streptozotocine (STZ). Les résultats *in vitro* ont montré que tous les peptides permettaient d'augmenter la sécrétion d'insuline avec des inductions jusqu'à 3 fois supérieures à l'induction contrôle. *In vivo*, deux types de tests ont été réalisés, la mesure de la glycémie (OGTT) et la mesure de l'insulinémie (ITT) suite à une administration de glucose. Comme attendu, les individus non diabétiques, ont gardé leur capacité à sécréter de l'insuline et de ce fait sont capables de réguler rapidement leur glycémie avec un pic glycémique qui n'excède pas 181,8 mg/dL. Les souris diabétiques non traitées ou traitées avec le tampon (ammonium bicarbonate 0.1N) présentent une hyperglycémie avec un pic glycémique respectivement de 350,2mg/dL et de 426,8mg/dL et ont perdu leur capacité à sécréter de l'insuline. Aucun effet n'est observé au niveau de la glycémie pour le peptide Pep16 ainsi que pour les peptides Pep14, Pep20 et Pep21. En revanche, les souris diabétiques traitées avec le peptide Pep18 ont récupéré leur capacité à réguler leur glycémie et à sécréter de l'insuline. Ces résultats s'avèrent très prometteurs car les individus traités avec Pep18 retrouvent une glycémie équivalente à celle observée chez les individus non diabétiques, comme il a été décrit pour les antidiabétiques présents sur le marché (Tahara *et al.*, 2008). De plus, alors que de nombreux sécrétalogues ainsi que des thiazolidinediones induisent une prise de poids lors du traitement (Provilus *et al.*, 2011), on peut noter que le traitement avec Pep18 n'induit pas ce type d'effet secondaire sur la période étudiée. Enfin, il serait intéressant de regarder l'effet de Pep18 dans un modèle présentant une insulino résistance tel que les diabètes STZ induit couplés à un régime riche en lipides ou des souris génétiquement modifiées telles que les souris ob/ob ou les souris db/db.

Dans cette étude, nous avons montré la capacité de 6 peptides issus de la petite roussette *S. canicula* à induire la sécrétion d'insuline *in vitro*. Nous avons confirmé cet effet *in vivo* pour le peptide Pep18 avec une diminution de la glycémie et une récupération de la capacité à produire de l'insuline chez des souris présentant un diabète de type 2. Ces résultats sont donc prometteurs et révèlent un nouveau candidat potentiel pour le traitement du

diabète de type 2. Il serait intéressant de déterminer à quel groupe d'antidiabétiques pourrait être rattaché Pep18 en explorant son mode d'action.

1 **Shark peptides induce insulin secretion in *in vitro* and *in vivo* mammalian**
2 **model.**

3

4 **AUTHORS**

5 Laura GRIBOUVAL^{1,2} ; Elise DESSAUGE² ; Cécile GUIARDIERE² ; Aude GAUTIER¹ ; Alexandre LEDUC¹ ;
6 Céline ZATYLNKY-GAUDIN¹ ; Pascal SOURDAINE¹ ; Pierrick AUVRAY²

7

8 **AFFILIATION**

9 ¹ Normandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD,
10 Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), CS14032, 14032 CAEN, Cedex 5, France
11 ² KELIA, Parc Technopolitain Atalante Saint Malo, 35400 Saint Malo, France

12

13 ***CORRESPONDING AUTHOR**

14 Corresponding author: pascal.sourdaine@unicaen.fr/p.auvray@kelia-pharma.com

15

16 **KEYWORDS**

17 Bioactive peptide, diabetes, insulin, shark.

18

19 **SHORT TITLE**

20 Identification of potential antidiabetic from shark.

Introduction

Glucose is a key element in the regulation of the energy metabolism that is highly conserved through the species. In Mammals, the pancreas synthesizes two polypeptides regulating the circulating blood glucose level: the hyperglycaemic glucagon produced by the α -cells and the hypoglycaemic insulin generated by the β -cells. The mechanisms by which glucose controls β cell function are complex (Fu *et al.*, 2013). Under elevated blood glucose levels, but also under the direct influence of food in the digestive tract, insulin secretion is stimulated, allowing the storage of glucose and of the end products of digestion of carbohydrate foods. In order to maintain a stable glucose level, sensors will measure the amount of glycaemia and inform the β cells to induce insulin secretion. High glucose influx in β -cells is ensured by the glucose transporter GLUT2 constitutively expressed. Glucose is then immediately phosphorylated by the glucokinase, leading to the activation of glycolysis producing pyruvate which is oxidized through the mitochondrial tricarboxylic acid cycle to produce the Adénosine-Triphosphate (ATP). Increased ATP production induces a decrease in the ADP / ATP ratio leading to the closure of the ATP-dependent potassium channel (K^+ channel), a hetero-octamer channel composed of four subunits Kir 6.2 and four regulatory subunits SUR1. This closure generates a depolarization of the membrane allowing Ca^{2+} voltage-dependent channel opening, and increasing intracellular calcium. Calcium flux stimulates the release of insulin by exocytosis of insulin granules. Insulin is then released into the blood and binds to its receptors (IR-A, IR-B) in the different specific organs (liver, skeletal muscle...) to induce glucose absorption and storage. The perfect control of this process is crucial to avoid hypoglycemia or diabetes. Type-1 diabetes is an immune-associated destruction of pancreatic β cells classically considered to occur suddenly in late childhood or in adolescence (Daneman, 2006) whereas type 2 diabetes results from insulin resistance and β -cell dysfunction (Kahn, 2003). The prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a global health problem with 422 million of persons impacted in the world in 2014 (World Health Organization) and insulin resistance is the main metabolic abnormality of T2DM. That is why different treatment approaches were developed, based on insulin-sensitizing agents (Buchner *et al.*, 2015) or on molecules increasing insulin secretion.

The first type of these molecules is called “incretin-like”, they are mimetics of natural incretin hormones whose effects has been defined as postprandial enhancement of insulin secretion by gut-derived factors (Drucker, 2006). The second type of molecules, the “sulfonylurea-like”, have the particularity to be effective in absence of glucose since they are SUR1-agonists able to induce the K⁺ channel closure without the need for ATP from glycolysis (Sola *et al.*, 2015). Marine proteins or peptides are increasingly studied for their therapeutic properties, including antidiabetic molecules isolated from sharks. Recently, a peptide from the shark *Chiloscyllium plagiosum* liver has shown interesting activity against type 2 diabetes (Liu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015) by improving insulin secretion and decreases blood glucose level. This peptide, derived from a TBC1D15 protein, also repairs damaged pancreatic tissue in type 2 diabetic mice and reduces metabolism disorders associated with T2DM such as hepatic steatosis (Liu *et al.*, 2014). Another studies have revealed the antidiabetic effect in streptozocin-diabetic mice of a shark (*Squalus mitsukurii*) liver peptide (S-8300) (Huang and Wu, 2005) and its ability to decreased Fas expression in alloxan-diabetic mice by preventing apoptosis of pancreatic cells (Huang and Wu, 2009).

Chondrichthyes (sharks, skates, rays and chimeras) are the most distant group relative to Mammals possessing a distinct pancreatic gland with conservation of molecular, cellular, hormonal and functional features (Youson and Al-Mahrouki, 1999) including hypoglycemic effects of insulin (Anderson *et al.*, 2002) . Four distinct cell types are well conserved from Mammals to Chondrichthyes: α -cells producing glucagon, β -cells producing insulin, δ -cells producing somatostatin and Υ -cells producing pancreatic polypeptide (Kobayashi and Syed Ali, 1981). It has been shown from a long time that the little shark, *Scyliorhinus canicula* has a quite low glucose plasma levels and important hypoglycemia tolerance (Zammit and Newsholme, 1979) and that its modification of glucose level by insulin secretion was linked to seasonal variations associated to the gonadal development (Gutiérrez *et al.*, 1987). Others studies performed on vertebrates also revealed that the testicular Sertoli cells by secretion of anti-inflammatory and immunomodulatory factors could improve T2D treatment (Luca *et al.*, 2001, 2014; Fallarino *et al.*, 2009). Because the structure and the function of the pancreas are so

highly conserved from Chondrichthyes to Mammals, we have investigated glycaemia-regulating peptides isolated from tissues of *Scyliorhinus canicula*. In the current study, six peptides with antidiabetic function were identified and their corresponding chemically-synthesized forms were tested for their role on *in vitro* and *in vivo* insulin secretion. We demonstrated the capacity of the six peptides (Pep14, Pep16, Pep18, Pep20, pep21 and Pep28) from to induce insulin secretion on rat pancreatic beta cell line (RIN5F). We have also brought out the impact of Pep18 on the insulin secretion on *in vivo* mice model and the encapsulation of peptides by ionotropic gelation was performed in order to improve Pep18 effect. Finally, the mechanism of action of the different peptides was investigated.

Materials and methods

Peptides

A screening on different *Scyliorhinus canicula* tissues was performed by HPLC method. Tissues were dissected from mature male (n=30 animals), frozen and then ground in liquid nitrogen, homogenized in cold 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) at a 1:10 (w/v) ratio and centrifuged for 20 min at 35,000 g at 4°C. The supernatants were concentrated on Sep-pak C18 cartridges (Waters) and dried in a speed-vacuum. From Epididymis and testicular extracts, a first set of 50 HPLC runs was performed using MNon C18 column (Macherey Nagel) with a 1.33% acetonitrile (ACN)/min gradient from 0 to 60% in 0.1% TFA. Thirty two (32) fractions have been tested on *in vitro* insulin secretion assays. Positive epididymis fractions were further fractionated on C18 column with a 1.25% ACN/min gradient from 0 to 70% in 10 mM ammonium acetate. After 10 HPLC runs, the 35 collected fractions were assayed for *in vitro* insulin secretion. For the first testicular fractions, two of them were further fractionated on C8 column with a 0.25% ACN/min gradient from 16 to 43% in 0.1% TFA. For a set of resulting active fractions, a third HPLC separation was performed on C8 with a 20 min isocratic gradient of 36% ACN in 0.1% TFA. Final active fractions were analyzed by mass spectrometry carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF/TOF ion optics and OptiBeam on-axis laser irradiation with 1000 Hz

repetition rate. Peptide identification was generated using the Mascot 2.4.0 program (Matrix Science) search on a dogfish transcript libraries database provided by S. Mazan (Coolen *et al.*, 2007). Six peptides (Pep14, Pep16, Pep20, Pep21, Pep18, and Pep28) were highlighted presenting an activating effect on the insulin secretion *in vitro*. Pep14, Pep16, Pep20, and Pep21 were identified from testis fractions and Pep28 from an epididymis fraction. Precursors were identified as an Ran-binding protein for Pep14 precursor (pPep14), Cyclophilin A for pPep16 the same cold inducible protein for pP18, pPep20, pPep21, and a Heat shock protein for pPep28.

***In vitro* stability of the peptides**

Peptides were synthesized by Proteogenix (Schiltigheim, France) with a purity >85%. Kinetic stability of the peptides in different buffers was evaluated. Incubations of peptides for three concentrations (1 mg/ml ; 15 µg/ml ; 100 mg/ml) was performed during 8h and 24h at 4°C or at room temperature in 0.1 N Ammonium bicarbonate or in 0.9% NaCl . At the end of the incubation, 10 µL of each sample was diluted in 20% methanol containing/0.5% acetic acid buffer (v/v). The analyses were performed by reversed-phase liquid chromatography followed by electrospray ionization (ESI) in the positive mode and mass spectrometry (MS) detection. Data were acquired and processed using Hystar 3.2 and QuantAnalysis (Bruker), respectively. HPLC separation was performed with a solution of 20% (V/V) acetonitrile (Ref. 34851, Sigma Aldrich, France)/0.1% formic acid (Sigma Aldrich, France) in water (Ref. 34877, Sigma Aldrich, France). The reversed phase mode was selected (Acclaim C18; 5 µm, 100 x 2.1 mm, Dionex). The injected volume of sample was 20 µL and the “full loop” mode was applied. The MS and MS/MS parameters were optimized with a standard solution of peptides at 10 µg/mL in water/acetonitrile (50/50, v/v) containing 0.1% of formic acid. For each peptide, the most abundant ion formed in simple MS was selected for MS/MS fragmentation. In order to increase the sensitivity and the specificity of the method, the multiple reaction monitoring mode (MRM) was operated under specific fragmentations of each compound in MS/MS. The most specific daughter ions formed in MS/MS were used for quantification

Cell culture

The RIN-5F cell line was obtained from ATCC (LGC Promochem, France). This cell line, able to produce and secrete insulin, is a clone derived from the RIN-m rat islet line [Gazdar AF, PNAS, 1980, 77:3519]. The cells, cultured as adherent cells, were amplified in RPMI-1640 medium (Lonza, France) supplemented with 2 mM L-glutamine (Lonza, France), 10 mM Hepes (Lonza, France), 1 mM Na Pyruvate (Lonza, France), 4.5 g/L glucose (Sigma-Aldrich, France), 1.5 g/L sodium bicarbonate (Sigma, France) and 10% fetal calf serum (FCS; Ref. DE14 801F, Lonza, France) under a 37°C, 5% CO₂ humidified atmosphere.

***In vitro* insulin secretion assays**

For β -cell insulin secretion assay, cells were seeded at 2×10^5 cells/ml/well into 24-multiwell plates (200 μ l). Monolayers of cells were then cultured for 96 h at 37°C. Cells were washed three times with KRB buffer (500 μ L) (115 mM NaCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.7 mM KCl, 1.28 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄-7H₂O, 24 mM NaHCO₃, 0.1% BSA, 1.1 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH= 7.4) and incubated with 200 μ L of KRB buffer at 37°C. After 40 min, the buffer was replaced with 200 μ L of KRB buffer containing the treatment solution. Negative controls were KRB buffer alone (data not shown), 0.1% DMSO or 0.3 μ M ammonium bicarbonate and positive controls were repaglinide at 600 μ M or glibenclamide at 600 μ M. The test substances were tested at different concentrations ranging from 10 nM to 250 μ M. Peptides were solubilized in ammonium bicarbonate, repaglinide and glibenclamide were solubilized in DMSO. After an incubation of 20 min, cell culture media were collected and duplicates were pooled. A centrifugation step (200 g, 5 min, RT) was then performed and supernatants stored at -20°C until analysis of insulin concentrations by ELISA assay.

Insulin assay by ELISA

Insulin concentration was quantitated using the ELISA kit “Rat Insulin ELISA” (Mercodia, Sweden) according to supplier’s instructions. Insulin assay was realized on 10 µL of pure supernatants (excepted for supernatant of cells treated with Repaglinide that were diluted in calibrator 0). Optical density was read at 450 nm using a Multiskan EX ThermoLabsystems. For each, a calibrator curve and controls (KRB alone, Repaglinide and solvents) was performed. The detection limit was 0.15 µg/L.

Animals and diabetes induction

Eight-week-old C57/BL6 mice purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used in this study. The mice were housed and fed under specific pathogen-free conditions. *In vivo* studies were in compliance with National Animal Care and use committee guidelines (KELIA committee ref 69). Diabetic males were obtained by 3 weekly intraperitoneal administrations of low-dose streptozotocin (STZ, 60 mg / kg). STZ treatment induces a partial destruction of pancreas β cells. Mice with a glycaemia ≥ 160 mg/ml had been considered as diabetic. The STZ treatment had led to the development of type 2 diabetes at a frequency of 92.8%. Non diabetic mice were obtained by the injection of sodium citrate buffer instead of the streptozotocin.

***In vivo* tests of glycaemia and insulin secretion**

The non diabetic group was removed by a first randomization before injections of STZ. Then all mice that were considered as diabetic were randomized into 5 groups: non treated diabetic, diabetic treated vehicle (AB 0.1N), diabetic treated Pep18, diabetic treated Pep16 and diabetic treated glibenclamide. Glibenclamide, an antidiabetic of sulfonylureas family had been used as positive control. Peptides were administrated daily by intraperitoneal injections during 29 days. OGTT (Oral Glucose Tolerance Test) had been performed to measure the capacity of the mice to eliminated glucose as described below. Overnight fasting mice were treated and filled up with glucose (2g/kg). Submandibular blood samples had been collected in kinetic just before the administration of glucose (T-60min or T-30min) and at

different times (T30min, T60min, and T120min) after the glucose administration (T0). For ethics reasons, two sub groups of mice were carried out by treatment in order to limit blood sampling. Each mice sub group was collected one time in two, alternately. Conveniently and for ethical reasons, samples collected at T-60min and T-30min to verify mice diabetes was used as glucose level reference for T0 time. To measure blood glycemia, a drop of blood was then deposited on the measuring device OneTouch® UltraEasy. Blood samples were also collected from the submandibular vein by needle in lithium heparin tubes to measure the circulating insulin. Kinetic was performed at different times (T-60min, T15min, T30min, T60min, T90min and T120min). Plasma was collected by centrifugation and insulin concentration was determined by ELISA assay ("mice Ultrasensible ELISA" kit, Mercodia).

Formulation of nanoparticles (NP) by ionotropic gelation

NPs were prepared based on the ionotropic gelation method (Calvo and Remunan-Lopez, 1997) with a small modification. The method was based on electrostatic interactions between the amine group of Chitosan (CS) and the negatively charged group of Tripolyphosphate (TPP) as a polyanion. During the process involving chemical reaction, CS undergoes ionotropic gelation and precipitates to form spherical particles that were distinguishable by opalescence of solution. Low molecular weight of CS was dissolved in Milli-Q water containing 0.4% acetic acid to a concentration 2.8mg/ml. TPP was dissolved in Milli-Q water with a concentration of 1.75 mg/ml and Pep18 was added to a concentration of 2mg/ml. The peptide/TPP solution was added drop-wise into chitosan solution under continuous stirring at 220 rpm for 45 min at room temperature (chitosan/TPP mass ratio = 4:1 and a chitosan/peptide mass ratio = 14:1). The resulting opalescent of suspension was evaluated by measuring the turbidity (OD 500 nm) of the solution. NP suspensions were centrifuged at 24,000 g for 30 min at 10°C and rinsed in deionized water. Supernatants of both centrifugations were used for the measurement of free peptides by absorbance measurement (OD at 210 and at 250 nm).

***In vivo* peptides stability (HPLC-MS/MS analysis) pharmacokinetic**

CD-1 mice (RjOrl: SWISS; 6 weeks old) were purchased from Janvier Labs (St Genest, France). The day before the experiment, mice were randomized in 3 groups of mice, one composed of 3 mice (control group for T0) and 2 groups of 12 mice according to body weight criteria (homogenous average mass in each group). Each group of 12 mice were randomized in four sub-groups (3 mice/sub-group).

The experimental groups were defined as described : Group 1 (sub-groups 1a, 1b, 1c and 1d) treated with Pep18 free peptide by *PO* injection at 10 mg/kg; Group 2 (sub-groups 2a, 2b, 2c and 2d) treated with Pep18 encapsulated peptide by *PO* injection at 10 mg/kg. The last remaining group of three mice corresponds to the untreated mice used for the T0 blood collection time. For the pharmacokinetic study, blood samples were collected before administration (T0) on three mice by exsanguination, mice were anesthetized under isoflurane (Belamont, France). Then, at time 30 min, 1h, 2h, 4h, 16h, 24h, 48h and 72h after treatment, blood samples were collected. Three levels per mouse were performed. A minimum of 150 μ L of blood was collected from the submandibular vein by needle in lithium heparin tubes (Centravet, France) at the first collection time (T30min, T1h, T2h and T4h), and, by exsanguination and immediately transferred on lithium heparin tubes at the second time (T16h, T24h, T48h and T72h). For cardiac puncture of blood, mice were anesthetized under isoflurane. Plasma samples were prepared as soon as possible after blood collection (within 1h post collection). Samples were centrifuged for 10 min at 1,000 *g* (4°C). All the plasma was collected in dry microtubes and stored at -20°C until the extraction procedure. Seventy-five (75) μ L of plasma sample or standard solution were extracted by 75 μ L of the extraction buffer (20% methanol/0.5% acetic acid) and then centrifugated for 15 min at 14.000 rpm at 4°C. Seventy-five (75) μ L of supernatant were then 2-fold diluted in 75 μ L of injection buffer and 20 μ L was injected into the HPLC-MS/MS system. The analysis was performed by reverse-phase liquid chromatography followed by electrospray ionization (ESI) in the positive mode and mass spectrometry (MS) detection. Tandem mass spectrometry (MS/MS) was used to increase specificity and sensitivity. The detection was carried out with Amazon SL Ion Trap (Bruker) as mass spectrometrer. Data were acquired and processed using Hystar 3.2 and QuantAnalysis (Bruker) respectively. The concentration of peptide was determined in each sample according to the

standard curve. The maximal concentration (C_{max}), the exposure time (area under the kinetic curve, AUC_{0-24h}) and the half-life time (T_{1/2} hours) were evaluated. Two (2) conditions were tested: group 1, Pep18 free peptide PO injection 10mg/kg and group 2, Pep18 encapsulated PO injection 10 mg/kg. Blood sample collection was performed at different times: 30min, 1h, 2h, 4h, 16h, 24h, 48h, 72h.

Results

***In vitro* insulin secretion assays on RIN5F pancreatic rat cells.**

In the Peptisan project, a large screening by HPLC method was performed in different *S. canicula* tissues to highlight potential antidiabetic peptides. Final active fractions were analyzed by mass spectrometry and peptide identification was generated using the Mascot 2.4.0 program (Matrix Science) search on a dogfish transcript libraries database provided by S. Mazan (Coolen *et al.*, 2007). Preliminary studies highlighted six peptides (Pep14, Pep16, Pep20, Pep21, Pep18, and Pep28) presenting a potential activating effect on the insulin secretion *in vitro*. To optimize peptide activity, we first performed peptides stability tests in different buffers. We showed that all peptides presented a high stability (>85%) for a 24h incubation at room temperature in Ammonium bicarbonate 0.1N. This buffer was therefore chosen as vehicle for *in vitro* and *in vivo* assays. Then, *in vitro* experiments by ELISA tests revealed that the six selected peptides induced an interesting increase in insulin secretion on the RIN5F cells with different induction profiles (Figure 2). For Pep14, Pep16, Pep18 and Pep20, a 2-fold increase of relative insulin secretion to the control (red line) was observed for low doses of treatment (0.01 to 10µM, 0.01 to 1µM, 150µM and 0.01 to 0.05 µM, respectively) followed by insulin secretion decreases at higher doses. On the other hand, Pep28 and Pep21 present a dose-response effect with Pep28 showing a significant increase in insulin secretion at 50 µM and Pep21 at 150 µM. These results allowed us to classify the peptides in two groups according to their efficient concentrations. The first group, corresponding to Pep21 and Pep28, induced a 2.5 to 3-fold increase in insulin secretion comparatively to control (buffer) at a concentration of 250 µM. The second group (Pep14, Pep16 and Pep18 and Pep20) induced a 2 to 3.5-fold increase in insulin secretion

comparatively to control at a lower concentration, between 0.01 μM and 5 μM . Positive controls have shown a 2.75-fold increase of insulin secretion with 600 μM repaglinide and a 1.46-fold increase of insulin secretion with 600 μM glibenclamide.

***In vivo* glycaemia assays**

In vivo effects of Pep18 and Pep16 have been evaluated in STZ-induced C57Bl/6 diabetic mice (figure3).. C57/BL6 mice were treated with three injections of streptozotocin at low doses (60mg/kg) to induce type2 diabetes that was confirmed by histological pancreas analyses where we observed a partial degradation of β cells islets (supplementary data). Moreover, because Pep18 is originated from the *Scyliorhinus canicula* testes, histological testis analyses were also performed and show that at the end of the experiment (D35) the Pep18 treated mice do not present any spermatogenesis defects (supplementary data). Finally, the daily monitoring of the weight (supplementary data) and the general state of health strongly suggest that Pep18 does not present toxicity in mice. After the first day of treatment by peptides or Glibenclamide (D1), the group of diabetic mice presented similar fasting glycemia compared to non diabetic mice when measured before glucose administration (Figure 3A). Thirty minutes after glucose administration (T30min), as expected, non diabetic mice have regulated their glycemia (181.8 mg/dL) compared to diabetic mice and control (AB) diabetic mice that presented a blood glucose concentration about 2 fold higher (350.2 mg/dL and 426.8mg/dL respectively). At T30min, Pep18-treated diabetic mice have shown a significant lower glycemia (109 mg/dL) compared to non diabetic mice (181.8 mg/dL) and to glibenclamide-treated diabetic mice (291.2 mg/dL). No significant decrease in glycemia was observed for Pep16-treated diabetic mice compared to diabetic or control (AB) diabetic mice. At T60min, the glycemia of Pep18-treated diabetic mice was not significantly different from that non diabetic mice whereas the other groups still had a higher glycemia. Finally, at T120min, glycemia of the different groups return to the baseline around 100mg/dL. After ten days of treatment (D10) of mice with peptides or Glibenclamide, the OGTT results shown, as previously observed at D1, a fast regulation of the glycemia, observed at T30min, in non diabetic mice

and in Pep18-treated diabetic mice compared to other groups, confirming efficacy of Pep18 (Figure 3B). It was also noticed that Glibenclamide was less efficient to regulate glycemia of diabetic mice at D10 compared at D1. As for Pep16, no modification of the glycaemia was observed for Pep14-, Pep20- or Pep28- treated mice (data not shown). At day 35 (D35) another OGTT was performed six days after the end of the treatment (data not shown). At T30min post glucose administration, Pep18-treated diabetic mice shown a glycemia (310.71mg/dL) significantly lower ($P<0.05$) than diabetic mice (367.8 mg/dL) and control (AB) diabetic mice (387 mg/dL). However, at T30min Pep18 diabetic mice glycaemia is significantly higher ($P<0.01$) than that non diabetic mice (164 mg/dL). Accordingly, to these *in vivo* results, only Pep18 was tested for *in vivo* insulin secretion tests.

***In vivo* insulin secretion assays**

Insulin concentrations were analyzed on Pep18 treated mice to determine if the regulation of the glycemia is due to an increase of insulin secretion or a compensatory mechanism (Figure 4). In non diabetic mice, as expected, an insulinemic peak was observed at T15min post-administration of glucose followed by a return to the baseline at T30 min. In non treated or vehicle treated diabetic mice insulinemia was nul or very low whatever the glucose post-administration time, confirming the effectiveness of streptozotocin to induce diabetes. Pep18-treated mice shown a similar insulinemia profile than that observed for non diabetic mice with an insulinemic peak at T15min post-administration of glucose followed by a return to the baseline at T30 min. A large standard deviation in the group of Pep18-treated mice was observed at T15min due to a strong insulin secretion of one mouse however, all mice of this group have a T15min insulinemia superior to 0.38 μ g/mL which is largely superior to the insulinemia value observed at T15min in diabetic control mice (values below the detection threshold).

Encapsulation and pharmacokinetic

Peptides were encapsulated by ionotropic gelation, a method based on chitosane / tripolyphosphate (TPP) nanoparticles. Two protocols were tested for Pep18 encapsulation, when Pep18 is first mix to chitosan, only 5,02 % of Pep18 was encapsulated whereas the addition of Pep18 in the TPP first, allowed to obtain 51.73% of encapsulated peptide (figure 5). Therefore, this last condition has been chosen for the pharmacokinetic assay. Mice were administered with Pep18 free peptide 10 mg/kg or with Pep18 encapsulated in nanoparticles (NP-Pep18) 10 mg/kg via *per os* (PO) injection. For NP-Pep18, the fact that 51.73% of the peptide was encapsulated was taken into account in order to properly administer a peptide concentration of 10 mg/kg. Pharmacokinetic reveal that there is no difference between the release profile of Pep18 free and NP-Pep18 in mice plasma. For both conditions, we noticed, from T0h to T2h, a plasma peptide concentration between 1.25 and 1.45 $\mu\text{g/ml}$, then, at T4h a release peak with an increase in peptide concentration to 1.60-1.80 $\mu\text{g/ml}$. At T16h the peptide concentration has decreased (1.14 $\mu\text{g/ml}$) and finally we observed a stabilization of Pep18 plasma concentration from T16h to T72h (about 1.10-1.20 $\mu\text{g/ml}$). However, we can also notice that at the time of peak release the maximum peptide concentration that have been recorded is 1.78 $\mu\text{g/ml}$ corresponding to only 1.64% of the total administered peptide.

Discussion

In the current study, we examined the capacity of peptides from the little shark *Scyliorhinus canicula* to induce *in vitro* and *in vivo* insulin secretion in a mammalian model. Six shark peptides (Pep14, Pep16, Pep18, Pep20, and Pep28) were selected based on their ability to induce insulin secretion *in vitro*. Two secretion profiles have been highlighted *in vitro*. While Pep21 and Pep28 increased insulin secretion in a dose-dependent manner, Pep16, Pep18, Pep14 and Pep20 were more efficient at low concentrations. In particular, Pep16 and Pep18 showed a maximal induction, similar to 600 μM repaglinide positive control, for the minimal concentration tested of 0.01 μM . Despite our large dose range (0.01 μM to 100 μM), a decrease of the induction of insulin secretion was observed for the higher concentrations tested but could not be observed for the lowest concentration tested, suggesting non-

monotonic dose-response which can arise from opposing effects induced by multiple targets, cellular desensitization or negative feedback with increasing dose as observed for endocrine disruptors (Lagarde *et al.*, 2015). As low IC50 are attractive features for bioactive peptides, it would be interesting to test even lower doses for these two peptides.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) syndrome is a pathology reclaiming new treatments with fewer side effects and easier administration for patients, the oral route being favored. In order to determine the antidiabetic potential of candidate molecules, different T2DM models have been described such as Streptozotocin (STZ) or Alloxan (ALX) induced diabetic mice or rats, or spontaneous/genetically derived diabetic animals (Srinivasan and Ramarao, 2007). All these models present a deficient insulin secretion that not allows appropriate glycaemia regulation and/or present insulin resistance preventing glucose storage. Chemically induced models (STZ and ALX) develop different types of diabetes depending on the drug dosage. Indeed streptozotocin (STZ) was described in the induction of type 1 diabetes by a single high dose of STZ at 100-200mg/kg (Ito *et al.*, 1999) or by multiple low doses of STZ (over 5) at a concentration range from 20-40mg/kg (Like and Rossini, 1976). On the other hand, low doses of STZ can also be used to simulate T2DM in mice and be effective for therapeutics assays (Reed and Scribner, 1999). In order to evaluate the impact of our peptides on insulin secretion and to determine if the insulin induced secretion was sufficient to decrease diabetic mice glycaemia, *in vivo* assays were performed by Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) on streptozotocin induced diabetic mice. The induction of T2DM by the STZ was first validated by histological analyzes of the pancreas. In accordance to the literature (Garza-Rodea *et al.*, 2010), STZ induced diabetic mice pancreas present partial degradation of the Langerhans islets with irregular morphology of residual islet (Diabetic NT acini area : 6928 μm^2 ; Non diabetic acini area : 11211 μm^2), decrease in number of islet (Diabetic NT : 7.67 acini/slides; Non diabetic : 9,67 acini/slides) and disruption of islet architecture (supplementary data 2). Secondly, the glycaemia obtained at T30min during the OGTT for non-treated STZ induced diabetic mice (360mg/dL (D1) – 303mg/dL (D10)) were close to that observed in other T2DM models: alloxan induced diabetic mice (glycaemic peak \approx 18mmol/L = 324 mg/dL) (Schulte in Walde *et al.*, 2002) and,

streptozotocin and nicotinamide induced diabetic mice ($\approx 300\text{mg/dL}$) (Tahara *et al.*, 2011). Finally, the sharp decrease in insulin secretion observed in our STZ-induced diabetic mice after glucose administration ($< 0.15 \mu\text{g/L}$) confirmed the incapacity of the mice to secrete enough insulin to regulate their glycaemia in control conditions. Due to the encouraging results obtained *in vitro*, the antidiabetic potential of Pep16 and Pep18 peptides was tested *in vivo* on this diabetic mouse model.

In vivo OGGT revealed, at the first day of treatment, that Pep16 showed no effect on the regulation of mice glucose level. The same results were observed for Pep14, Pep20, Pep21 and Pep28 (data not shown). In contrast, Pep18 induced an important blood glucose decrease in diabetic mice thirty minutes after glucose administration, to retrieve a basal value at T120min. Interestingly, glycaemia obtained at T30min is lower than the one observed in glibenclamide treated diabetic mice and lower or similar to the non-diabetic mice at D1 and D10 respectively. Studies on antidiabetics in use reveal an efficacy on glycaemia regulation close to what has been observed for Pep18. Indeed, after a liquid meal tolerance test (LMTT), antidiabetics induce a decrease in plasma glucose level of mildly diabetic rats (corresponding to T2DM rats) to recover a glycaemia profile close to the non-diabetic rats (glycemic peak $\approx 120\text{-}150 \text{ mg/dl}$), as observed for Voglibose (0.3mg/kg), Metformin (300 mg/kg), Glibenclamide (3mg/kg), and Sitagliptin (1mg/kg) (Tahara *et al.*, 2008). Moreover, Tahara and colleagues also showed that the regulation of the glycaemia observed for those antidiabetic drugs were equivalent to an insulin administration of 0.2 IU/kg . Finally, only the administration of 0.5 IU/kg of insulin as been described (Tahara *et al.*, 2008) to induce a plasma glucose level lower than that of non-diabetic individuals, as observed for Pep18 at D1. Those results revealed the high potential of Pep18 to regulate glycaemia in diabetic mice.

Insulin assays performed at D17 also confirmed the antidiabetic effect of Pep18 which showed an increase in insulinemia fifteen minutes after glucose administration ($1.09 \mu\text{g/L}$) in contrast to diabetic mice treated with AB buffer ($< 0.15 \mu\text{g/L}$). Interestingly, Pep18 treated mice have recovered their ability to secrete insulin, indeed there is no significant difference between Pep18 treated mice insulinemia and Non diabetic mice insulinemia profiles. These results strongly suggest that the

decrease in blood glucose level observed at D1 and D10 is due to an increase in insulin secretion and not to a glucose uptake failure or an up regulation of muscle metabolism.

Because they do not exhibit insulin resistance, ALX and STZ diabetic animals are most widely used for screening the compounds including natural products for their insulinomimetic, insulinotropic and other hypoglycaemic/antihyperglycaemic activities (Srinivasan and Ramarao, 2007). It is now envisaged to validate the potential of Pep18 on type 2 insulin resistance model such as Lep^{ob} mice. Those mice present inherited autosomal recessive mutation of the Leptin gene inducing a marked hyperphagia, a decreased in energy expenditure but also T2DM like syndrome of hyperglycaemia, mild impaired glucose tolerance, insulin resistance, severe hyperinsulinaemia, sub fertility and impaired wound healing (Srinivasan and Ramarao, 2007) which closely reproduces the characteristics of the T2DM patient.

The interest of finding new antidiabetic molecules is mainly evaluated in relation to their use in human therapy. It is therefore important to notice that Pep18 is efficient *in vivo* at a concentration of 10mg/kg, a concentration that can be adapted for human treatment. Indeed, if the same efficiency is confirmed in human, the women average weight being 62.4kg and men average weight being 77.4 kg it allows a Pep18 administration of about 774 mg/person/meal. This posology is in agreement with the commonly used antidiabetic Metformin where an administration of one 500mg or 850mg tablet 2-3 times daily, during or at the end of meals is recommended (Food and drug administration (FDA)).

Moreover, the use of a peptide for a therapy present many advantages compared to others typical small molecule drugs that currently make up the pharmaceutical market. Peptides have a great potential as therapeutics because of their small size that allow an easy administration, their high specificity which lead to a decrease in side effects and toxicity, and a low tissue accumulation (Craik *et al.*, 2013). However, they also have some disadvantages especially a low bioavailability and a poor metabolic stability compared to other small drugs molecules (<500Da) (Craik *et al.*, 2013). Oral bioavailability of peptides is also limited by their degradation in the gastrointestinal tract as well as their inability to cross the epithelial barrier (Bruno *et al.*, 2014). Different techniques have been

described to overcome peptides poor stability including nanoparticle encapsulation (Renukuntla *et al.*, 2013). In order to be able to administrate Pep18 orally *in vivo*, nanoparticle encapsulation assays based on chitosan were developed. Pharmacokinetic of free and Chitosan/Tripolyphosphate (TPP) Pep18 nanoparticles was performed over a period of 72 hours. Despite a good encapsulation ratio when Pep18 is first added to TPP (51.73%), the same release profile was obtained for the non-encapsulated form and the encapsulated form *in vivo*. A peak of amount of the peptides was observed in mice plasma at T4h and then a constant flow of peptide was noticed up to 72h. However, at the highest release level (T4h), only 1.64% of the injected peptides were found in mice plasma, which is strongly below to what has been achieved with the same type of encapsulation for insulin (maximum release \approx 80%) (Pan *et al.*, 2002). Neither OGTT nor ITT have been done to determine if this few quantity of this orally-administrated Pep18 was sufficient to induce a regulation of the glycaemia due to the limited blood samples available. Considering the high performance *in vitro* of Pep18 at very low concentrations, it would be interesting to assess if this few amount of available peptide in blood is also able to induce insulin secretion and to restore mice glycaemia. As TPP encapsulation did not increased Pep18 bioavailability after an oral administration, another type of peptide encapsulation or another technique to stabilize Pep18 should therefore be envisaged. Indeed, the oral drug administration remains the most preferred mode of drug administration for patients.

Finally, it would be interesting to determine the mode of action of Pep18 that led to the increase of insulin secretion, especially since the two other forms derived from the same precursor did not present the same insulin secretion profile *in vitro* and were not effective *in vivo*. In the present state of mind, four major types of antidiabetic have been described : the insulin secretalogues, the insulin sensitizers, the glucosidase inhibitors and the incretins (for review, Bosenberg and Zyl, 2008). As Pep18 induced insulin secretion by β pancreatic cells *in vitro*, its major mode of action probably not correspond to the α glucosidase inhibitors which act at the level of the intestinal villi (Ahamad *et al.*, 2011). On the other hand, none of the 3 other types of mode of action described for other anti-diabetic drugs, which all directly act on β cells islets to induce insulin secretion, can be excluded.

To conclude our study revealed the potential of a marine peptide, Pep18, to induce insulin secretion on rat beta cell lines, and to restore normal blood glucose level and insulinemia in diabetic mice. In addition, this peptide showed highest efficiency at low concentrations *in vitro* (0.01 μ M) so the development of stabilization processes for this molecule could offer good perspectives for type 2 diabetes mellitus oral treatment.

Acknowledgments

This research was supported by the “Conseil Régional de Basse-Normandie” and “Fonds Européen de Développement Régional” (PEPTISAN project) certified by the competitiveness cluster “Pole Mer Bretagne”). Laura Gribouval PhD studies are supported by ANRT and Kelia (CIFRE grant). We also thank Benoit Bernay from the Proteogen platform (University of CAEN) for mass spectrometry analysis associated to peptide identification.

Bibliography

- Ahamad J, Naquvi KJ, Mir SR, Ali M and Mohd S** (2011) REVIEW ON ROLE OF NATURAL ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORS FOR MANAGEMENT OF DIABETES MELLITUS. *International Journal of Biomedical Research*.
- Anderson WG, Ali MF, Rg I, Einarsdó E, Schäffer L, Hazon N and Conlon JM** (2002) Purification, Characterization, and Biological Activity of Insulins from the Spotted Dogfish, *Scyliorhinus canicula*, and the Hammerhead Shark, *Sphyrna lewini*.
- Bosenberg LH and Zyl DG Van** (2008) The mechanism of action of oral antidiabetic drugs : A review of recent literature Insulin secretagogues. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa* **13**.
- Bruno BJ, Miller GD and Lim CS** (2014) Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *National Institutes of Health* **4** 1443–1467.
- Buchner DA, Charrier A, Srinivasan E, Wang L, Paulsen MT, Ljungman M, Bridges D and Saltiel AR** (2015) Zinc finger protein 407 (ZFP407) regulates insulin-stimulated glucose uptake and glucose transporter 4 (Glut4) mRNA. *Journal of Biological Chemistry* **290** 6376–6386.
- Calvo P and Remunan-Lopez C** (1997) Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied ...* 125–132.
- Coolen M, Sauka-Spengler T, Nicolle D, Le-Mentec C, Lallemand Y, Silva C Da, Plouhinec J-L, Robert B, Wincker P, Shi D-L et al.** (2007) Evolution of Axis Specification Mechanisms in Jawed Vertebrates: Insights from a Chondrichthyan. *PLoS ONE* **2** e374.

- Craik DJ, Fairlie DP, Liras S and Price D** (2013) The Future of Peptide-based Drugs. *Chemical Biology & Drug Design* **81** 136–147.
- Daneman D** (2006) Type 1 diabetes. *MedlinePlus Medical Encyclopedia* **367**.
- Drucker DJ** (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism* **3** 153–165.
- Fallarino F, Luca G, Calvitti M, Mancuso F, Nastruzzi C, Fioretti MC, Grohmann U, Becchetti E, Burgevin A, Kratzer R et al.** (2009) Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated Sertoli cell xenografts alone. *The Journal of Experimental Medicine* **206** 2511–2526.
- Fu Z, Gilbert ER and Dongmin L** (2013) Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **100** 130–134.
- Garza-Rodea AS De, Knaän-shanzer S, Hartigh JD Den, Verhaegen APL and Van DW** (2010) Anomer-Equilibrated Streptozotocin Solution for the Induction of Experimental Diabetes in Mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **49** 40–44.
- Gutiérrez J, Fernández J and Planas J** (1987) Seasonal variations of insulin and some metabolites in dogfish plasma, *Scyliorhinus canicula*, L. *General and Comparative Endocrinology* **70** 1–8.
- Huang F and Wu W** (2005) Antidiabetic effect of a new peptide from *Squalus mitsukurii* liver (S-8300) in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmacy and Pharmacology* 1575–1580.
- Huang F and Wu W** (2009) Study on the antidiabetic mechanism of a shark liver peptide, S-8300, in alloxan-induced diabetes. *J Pharm Pharmacol* **61** 789–794.
- Ito M, Kondo Y, Akiko N and Atsuhito N** (1999) New model of progressive Non Insulino-Dependent Diabetes Mellitus in mice induced by streptozotocin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **22** 988–989.
- Kahn SE** (2003) The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* **46** 3–19.
- Kobayashi K and Syed Ali S** (1981) Cell Types of the Endocrine Pancreas in the Shark *Scyliorhinus stellaris* as Revealed by Correlative Light and Electron Microscopy*. *Cell Tissue Res* **215** 475–490.
- Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M and Rousselle C** (2015) Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors : a qualitative method of assessment. *Environmental Health* **14** 1–15.
- Li Y, Wang W, Cheng D, Wang T, Lu C, Chen J, Nie Z, Zhang W, Lv Z, Wu W et al.** (2015) A new member of the TBC1D15 Family from *Chiloscyllium plagiosum* : Rab GTPase-Activating Protein Based on Rab7 as a Substrate. *Marine Drugs* **13** 2955–2966.
- Like AA and Rossini AA** (1976) Streptozotocin-Induced Pancreatic Insulinitis : New Model of Diabetes Mellitus. *Science* **193** 415–417.
- Liu Y, Gao Z, Guo Q, Wang T, Lu C, Chen Y, Sheng Q, Chen J, Nie Z, Zhang Y et al.** (2014) Anti-diabetic effects of CTB-APSL fusion protein in type 2 diabetic mice. *Marine Drugs*.
- Luca G, Calvitti M, Neri LM, Basta G, Brozzetti A, Saturni A, Mughetti D, Becchetti E, Capitani S, Brunetti P et al.** (2001) Mitogenic Effects of Rat Sertoli Cells on Adult Homologous Islet β -Cells : In Vitro and In Vivo Studies. **1345** 681–682.

- Luca G, Cameron DF, Arato I, Mancuso F, Linden EH, Calvitti M, Falabella G, Szekeres K, Bodo M, Ricci G et al.** (2014) Xenograft of microencapsulated sertoli cells for the cell therapy of type 2 diabetes mellitus in spontaneously diabetic nonhuman primates: Preliminary data. *Transplantation Proceedings* **46** 1999–2001.
- Pan Y, Li Y, Zhao H, Zheng J and Xu H** (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system : chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International Journal of Pharmaceutics* **249** 139–147.
- Provilus A, Abdallah M and Mcfarlane SI** (2011) R eview Weight gain associated with antidiabetic medications R eview. *Therapy* **8** 113–120.
- Reed MJ and Scribner KA** (1999) pharmaceutical drug discovery. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **1** 75–86.
- Renukuntla J, Dutt Vadlapudi A, Patel A, Boddu SH and Mitra AK** (2013) Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics* **447** 75–93.
- Schulte in Walde S, Dohle C, Schott-ohly P and Gleichmann H** (2002) Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. *Life Science* **71** 1681–1694.
- Sola D, Rossi L, Schianca GPC, Maffioli P, Bigliocca M, Mella R, Corlianò F, Paolo Fra G, Bartoli E and Derosa G** (2015) Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science* **11** 840–848.
- Srinivasan K and Ramarao P** (2007) Animal models in type 2 diabetes research : An overview. 451–472.
- Tahara A, Matsuyama-yokono A, Nakano R, Someya Y and Shibasaki M** (2008) Hypoglycaemic Effects of Antidiabetic Drugs in Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Mildly Diabetic and Streptozotocin-Induced Severely Diabetic Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **103** 560–568.
- Tahara A, Matsuyama-yokono A and Shibasaki M** (2011) Effects of antidiabetic drugs in high-fat diet and streptozotocin – nicotinamide-induced type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology* **655** 108–116.
- Xia E, Zhu S, He M, Luo F, Fu C and Zou T** (2017) Marine Peptides as Potential Agents for the Management of Type 2 Diabetes Mellitus- A Prospect. *Marine Drugs*.
- Youson JH and Al-Mahrouki AA** (1999) REVIEW Ontogenetic and Phylogenetic Development of the Endocrine Pancreas (Islet Organ) in Fishes.
- Zammit BVA and Newsholme EA** (1979) Activities of Enzymes of Fat and Ketone-Body Metabolism and Effects of Starvation on Blood Concentrations of Glucose and Fat Fuels in Teleost and Elasmobranch Fish. **184** 313–322.
- Zhu C, Hong-Bing PM, Gui-Gin LB, Fan Z and Yong L** (2010) Beneficial effects of oligopeptides from marine salmon skin in a rat model of type 2 diabetes. *Nutrition* **26** 1014–1020.

Figure legends

Figure 1: Experimental scheme of *in vivo* assays.

Grey arrow represents the experimental scheme of the whole *in vivo* assay. Annotations above the arrow represent the important day of experimentation. The annotations below the arrow indicate the manipulations that have been made (STZ injections, OGTT, Insulin assay). Blue arrow represents the experimental scheme of the OGTT.

Figure 2: *In vitro* test of insulin secretion on RIN5F cells after treatment with peptides.

The peptides tested are Pep14, Pep16, Pep18, Pep20, Pep21 and Pep28. The results are expressed in % relative to the vehicle (Ammonium Bicarbonate 0.1N) and the red line represents the control induction by the Ammonium Bicarbonate. Statistic test ANOVA by the comparison of different group vs Ammonium bicarbonate treated cells. ***= p value <0.001; **= p value <0.01; *= p value <0.05; ns = non-significant, and the standard derivation (SD) has been determined (N= 3 ; n=3).

Figure 3: Evaluation of Pep16 and Pep18 *in vivo* effect on the glycaemia of diabetic mice by Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) at Day 1 (D1) and Day 10 (D10).

Mice were not treated or treated with Pep16, Pep18 or glibenclamide (positive control). Treatment administration is represented by blue arrow and glucose administration by red arrow. Blood samples were performed at 60min before *per os* glucose administration (T-60min) and at 30min, 60min and 120min post administration. Glycaemia is expressed in mg/dL. Statistical analyses are presented in the table. Statistic test 2-way ANOVA by the comparison of different groups vs Diabetic group treated with AB. ***= p value < 0,001; **= p value <0,01; *=p value < 0,05; ns = non-significant; N/A= Not Applicable, and the standard derivation (SD) has been determined. (n=10 mice per group)

Figure 4: Effect of Pep18 on insulin blood level at Day 17 (D17) on diabetic mice.

Sample kinetic has been performed at 15min, 30min, 60min, 90min and 120min post glucose administration. Data at T90min and T120min are not shown because no modification on insulin level was observed in relative to T60min. Insulin secretion is expressed in mg/dL. Statistic test 2-way ANOVA by the comparison of different groups vs Diabetic group treated with AB. a = non-significant; b= p value < 0,001, and the standard derivation (SD) has been determined. (n= 10 mice per group)

Figure 5: Long term effect of Pep18 on the glycaemia of diabetic mice by OGTT.

This experiment was performed at day 35 (D35) corresponding to 6 days after the end of the treatment. Sample kinetic has been performed at 30min before glucose administration and at 30min, 60min and 120min post administration. Statistic test 2-way ANOVA by the comparison of different groups vs Diabetic group treated with AB. ***= P < 0,001; **= p < 0,01; *=p > 0,05; ns = non-significant, and the standard derivation (SD) has been determined. (n= 10 mice per group)

Figure 6: Evaluation of Pep18 encapsulation efficacy.

Two conditions were tested, the first by adding the peptides to chitosane and the second one by adding the peptides to the TPP (tripolyphosphate) (A). Quantity of free peptide was evaluated after nanoparticle formation to estimate the encapsulated peptide. Pharmacokinetic was performed with Pep18 free peptide and Pep18 encapsulated peptide (NP-Pep18) at 10 mg/kg (B). At different time points (T30min to T72h), blood samples were collected in order to evaluate plasma peptide concentration. The standard derivation (SD) has been determined.

Supplemental data 1: Evaluation of the effectiveness of the streptozotocin (STZ) in inducing type 2 diabetes.

Pancreas were collected at day 45, fixed in Davidson and embedded in paraffin. Three μ m sections were performed and slides were colored with a Prenant-Gabe trichrome coloration. Observations were obtained from three individuals of each different group (n=3). **A** non-diabetic mice, **B** diabetic not

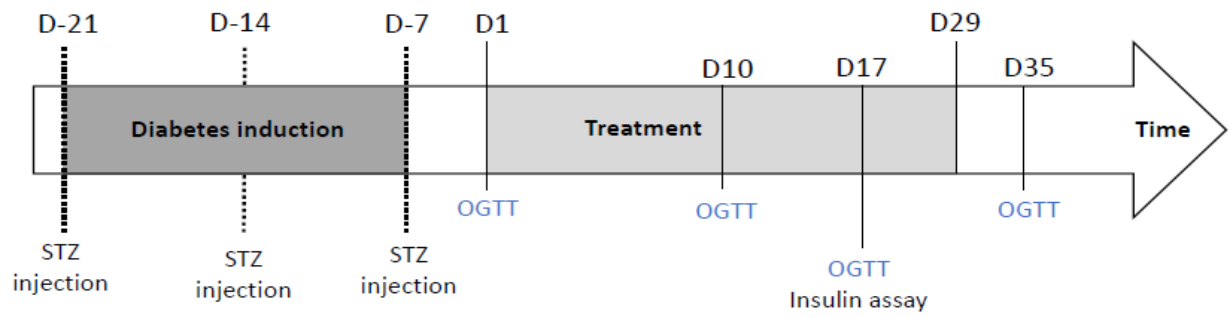
treated mice, **C** diabetic ammonium bicarbonate treated mice (AB), **D** diabetic Pep18 treated mice. Several histological abnormalities were detected in diabetic mice especially an increase in destructured Langerhans islets and in exocrine cells presenting few or no secretion granules. Pep18 seems having no effect on the morphology of the Langerhans islets. * Exocrine secreting cells with few or no secretion granules; ** Destructured Langerhans islets; *** “Empty” Langerhans islets.

Supplemental data 2: Treated mice weight monitoring.

Mice were weighed before each oral glucose tolerance test (OGTT). Measures have been performed at Day 1 and Day 10 that corresponded to the first and the last day of treatment and at Day 35 that corresponded to the 6th day post treatment. The weight evolution is represented for each treated group for the different times: non-diabetic mice (n=10), diabetic Ammonium bicarbonate treated mice (AB) (n=10) or Pep18 diabetic treated mice (n=11). Mice weight was stable over time and no weight difference was observed between the different groups. The vertical bars represent the standard deviation (SD).

Supplemental data 3: Evaluation of Pep18 effect on mice testes.

Testes were collected at day 45 (D45), fixed in Davidson and embedded in paraffin. Three (3) μm sections were performed and slides were colored with a Prenant-Gabe trichrome coloration. Observations were obtained from 3 individuals of each different group (n=3). **A** non-diabetic mice, **B** diabetic not treated mice, **C** diabetic ammonium bicarbonate treated mice (AB), **D** diabetic Pep18 treated mice. No effect of Pep18 was observed on spermatogenesis.



Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)



Figure 1

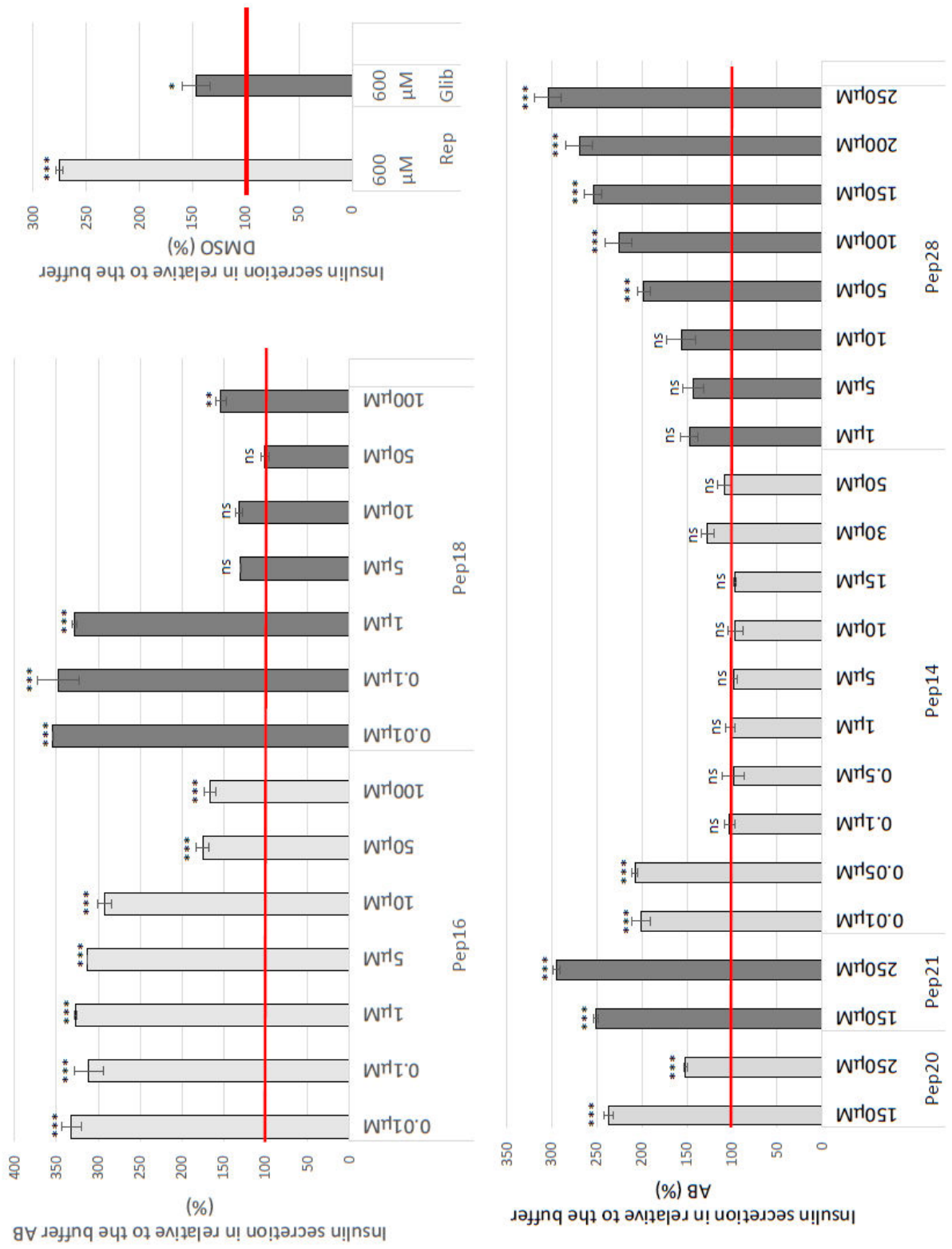
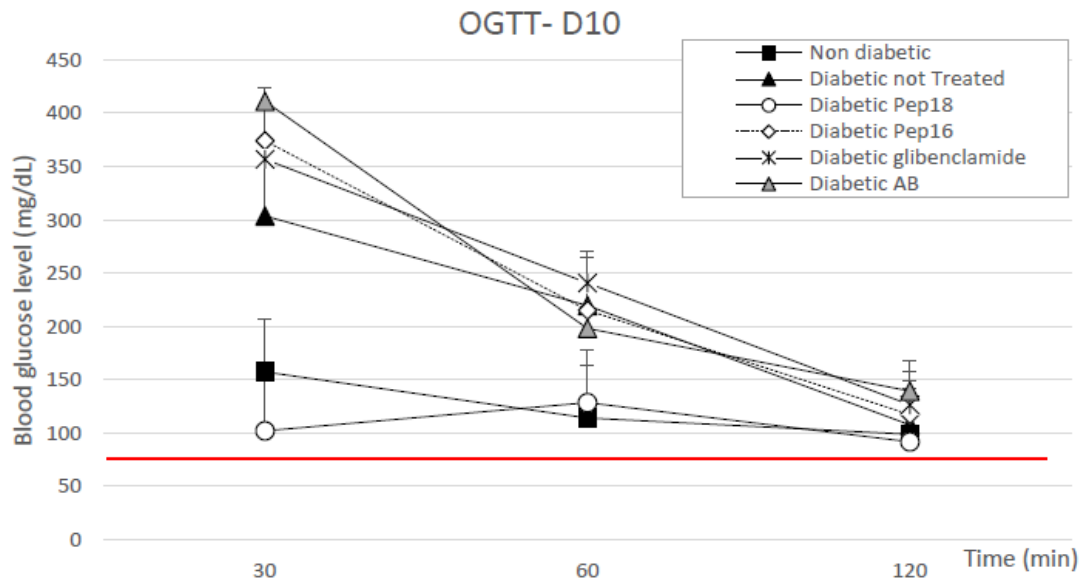
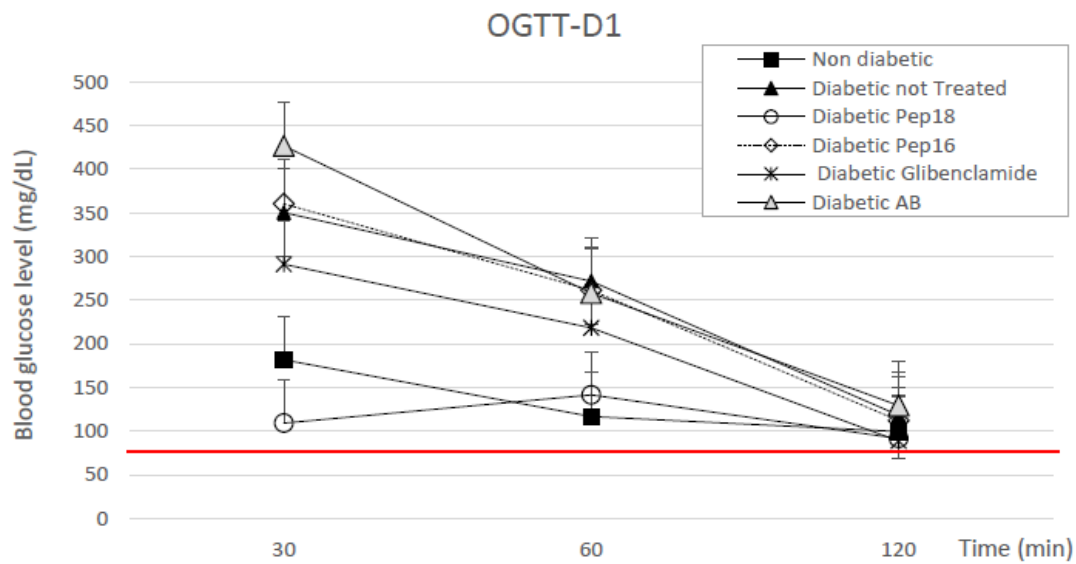


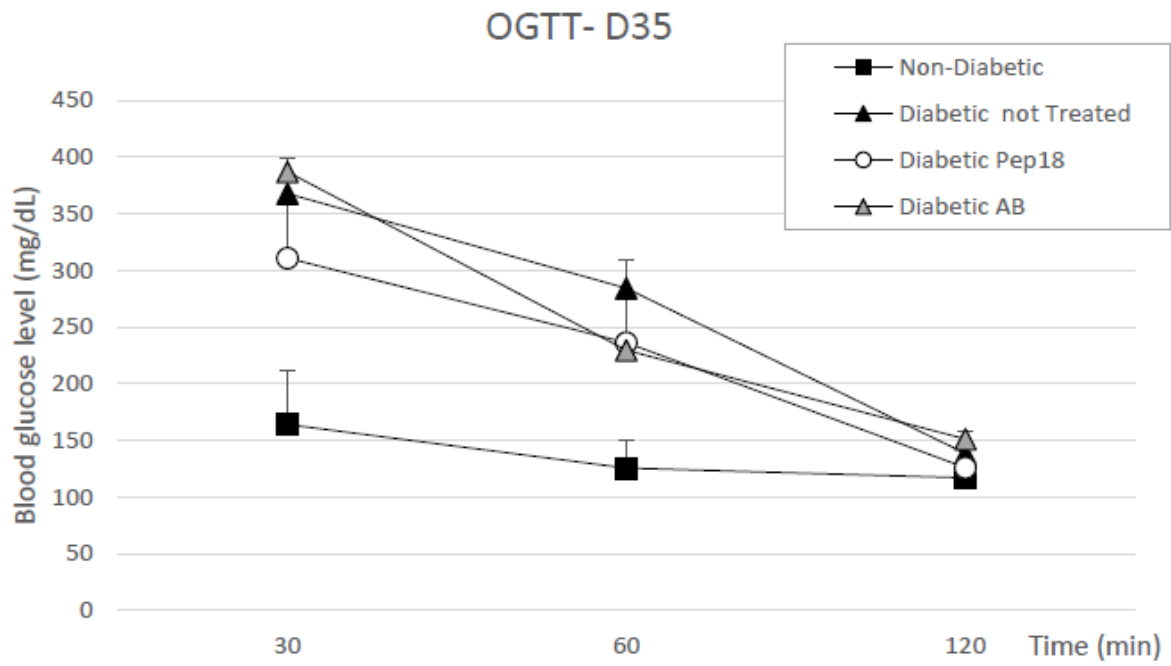
Figure 2



| D1 | No diabetic | Not treated † | AB 0.1N † | Pep18 10mg/kg † | Pep16 10 mg/kg † | Glibenclamide 10 mg/kg † |
|------|-------------|---------------|-----------|-----------------|------------------|--------------------------|
| T-60 | ns | ns | N/A | ns | ns | ns |
| T30 | *** | ** | N/A | *** | ** | *** |
| T60 | *** | ns | N/A | *** | ns | ns |
| T120 | ns | ns | N/A | ns | ns | ns |

| D10 | Non diabetic | Not treated † | AB 0.1N † | Pep18 10mg/kg † | Pep16 10 mg/kg † | Glibenclamide 10 mg/kg † |
|------|--------------|---------------|-----------|-----------------|------------------|--------------------------|
| T-60 | ns | ns | N/A | ns | ns | ns |
| T30 | *** | *** | N/A | *** | ns | ns |
| T60 | ** | ns | N/A | ** | ns | ns |
| T120 | ns | ns | N/A | ns | ns | ns |

Figure 3



| D35 | Non-diabetic | Not treated † | AB 0.1N † | Pep18 10mg/kg † |
|------|--------------|---------------|-----------|-----------------|
| T-60 | ns | ns | N/A | ns |
| T30 | *** | ns | N/A | * |
| T60 | *** | ns | N/A | ns |
| T120 | ns | ns | N/A | ns |

Figure 5

A

| | Peptide add to: | |
|--|-----------------|--------|
| | Chitosan | TPP |
| Peptide use for encapsulation(μg) | 5000 | 3000 |
| Quantity of free peptide (μg) | 4749 | 1448 |
| % of estimated encapsulated peptide | 5,02% | 51,73% |

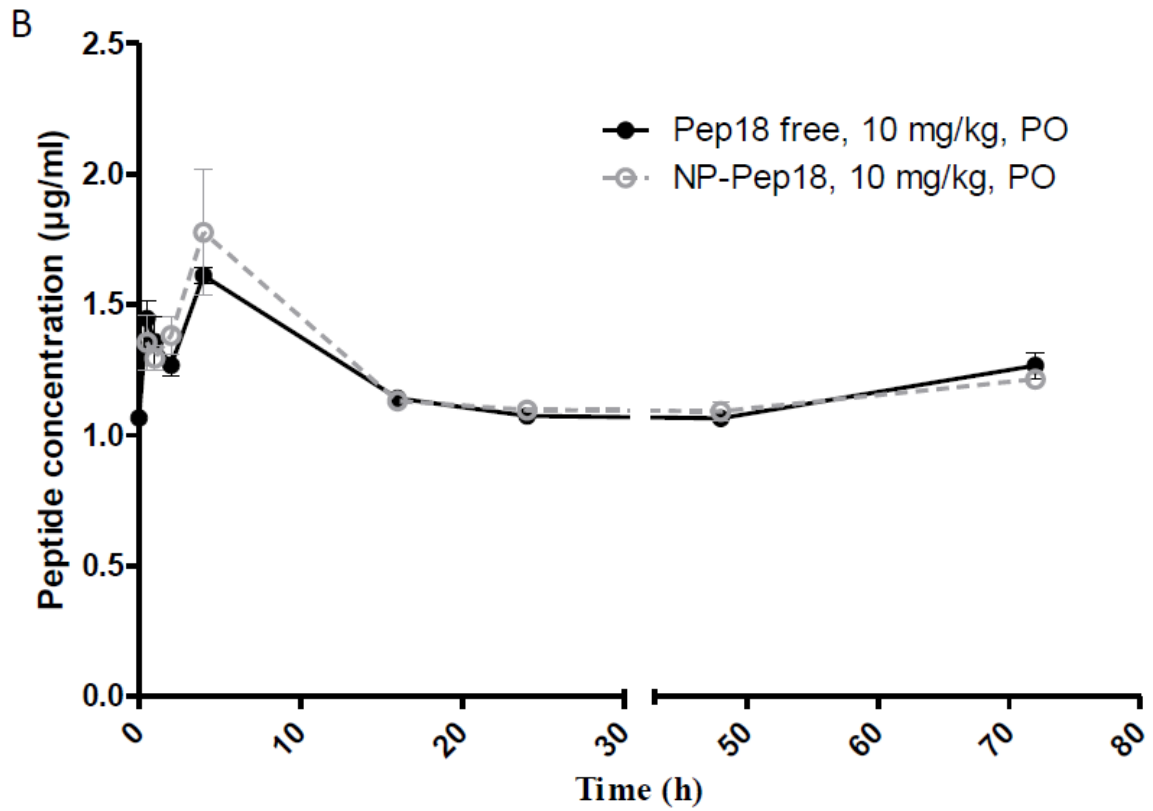
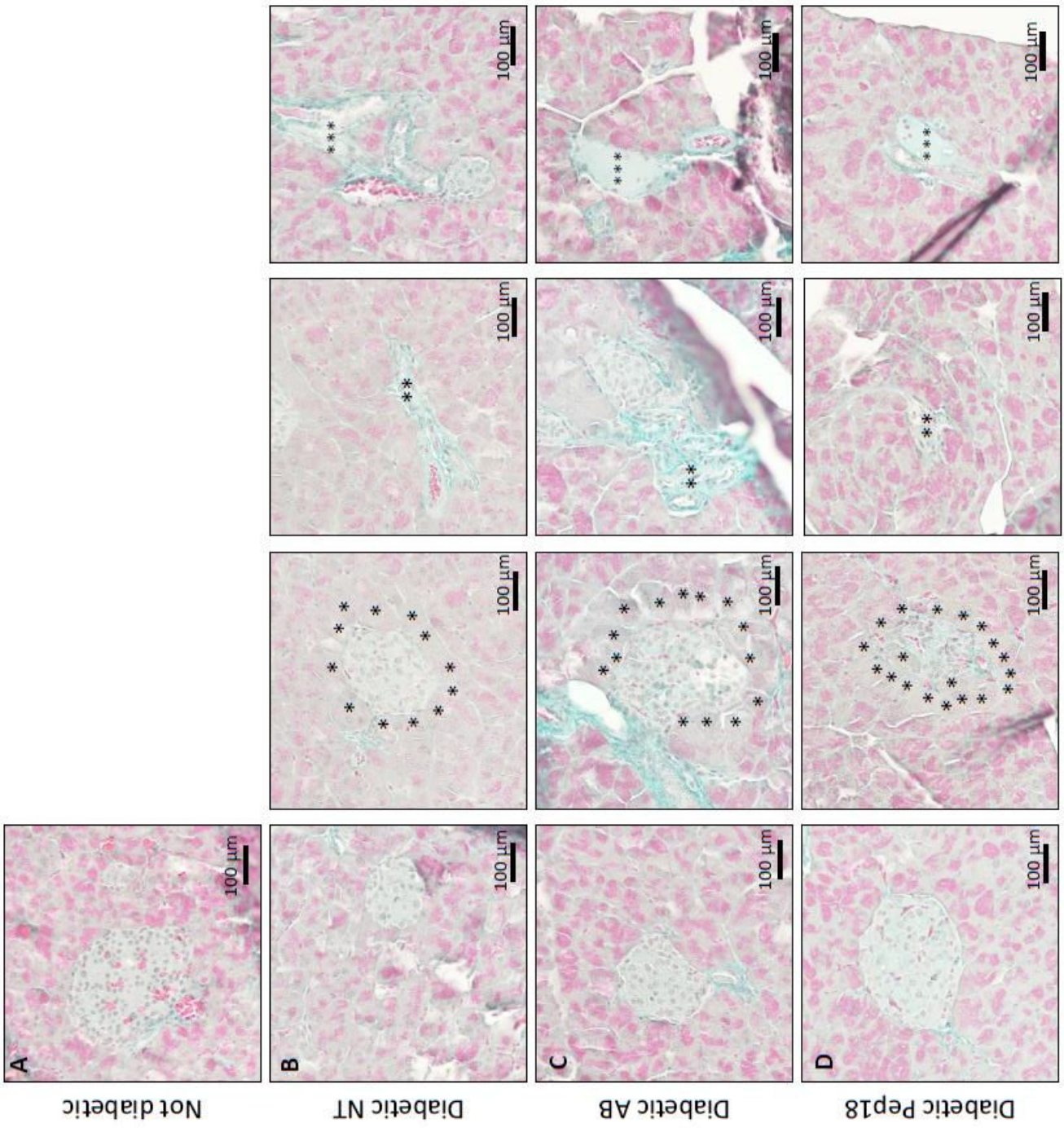
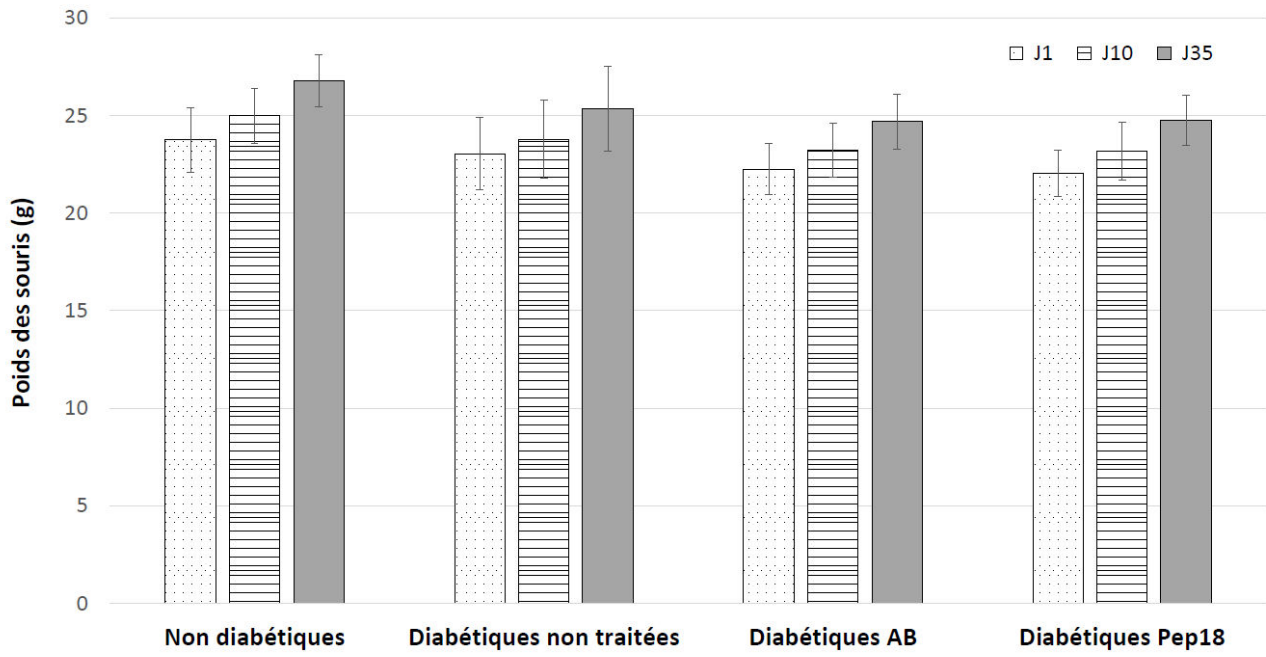


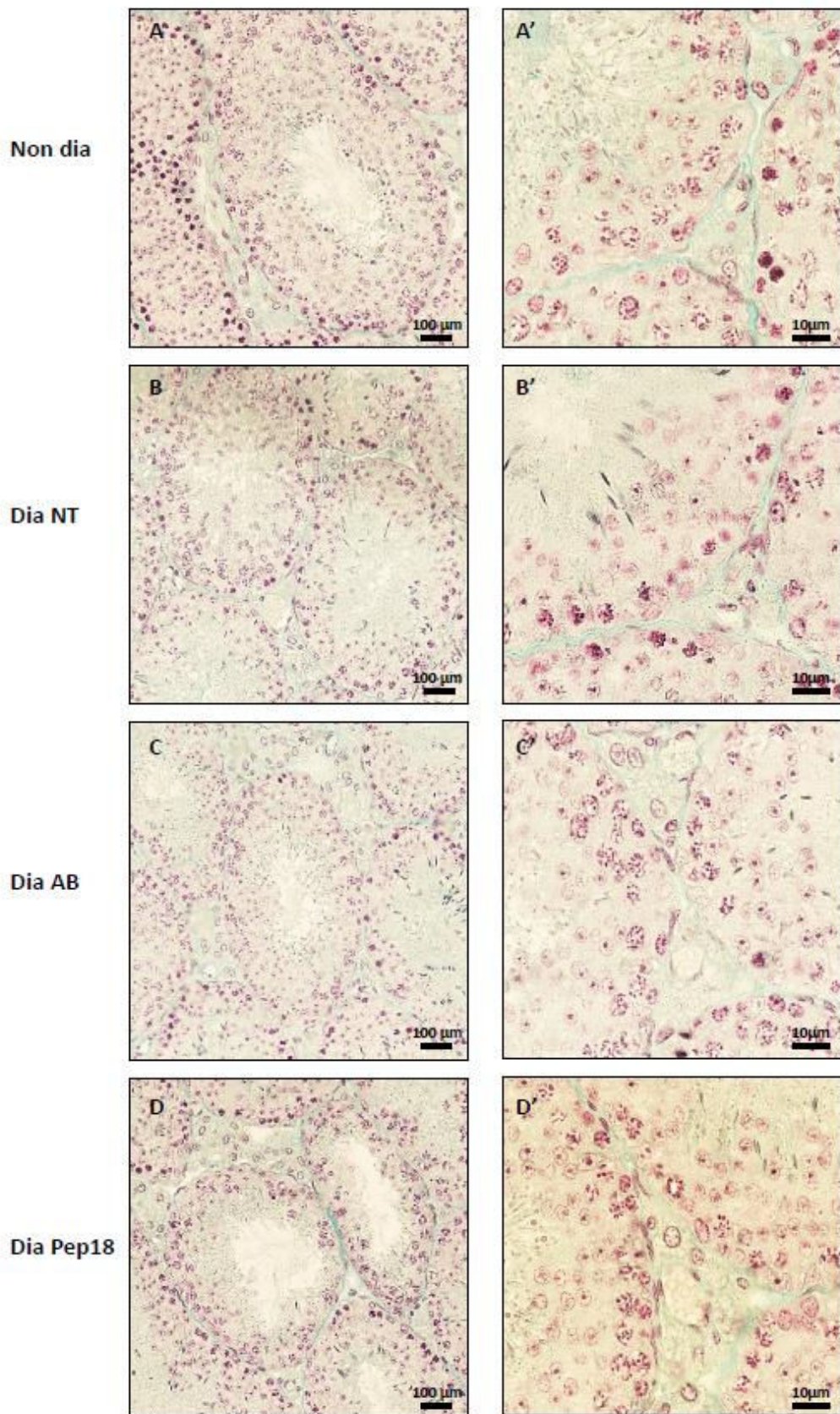
Figure 6



Supplemental data 1



Supplemental data 2



Supplemental data 3

Chapitre 5

CHAPITRE 5

Evaluation du potentiel anti-cancéreux de deux peptides issus de la petite roussette sur des cellules de carcinome pulmonaire humain

Introduction :

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde après les maladies cardiovasculaires. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques reste donc primordiale afin de lutter contre cette pathologie.

Les cellules cancéreuses, sont caractérisées par leur capacité à se multiplier anormalement et à se propager de façon anarchique suite à une perturbation du métabolisme cellulaire. Ces perturbations peuvent être engendrées par des facteurs intrinsèques tels que la mutation de gènes comme celui de l'APC responsable d'une prédisposition au cancer colorectal (pour revue, Jaspersen *et al.*, 2011) ou des facteurs extrinsèques tels que la pollution atmosphérique (for review, Parsa, 2012). Les mutations génomiques observées dans les cellules cancéreuses concernent notamment des gènes spécifiques du cycle cellulaire comme le pRB, point de contrôle de la phase G1 (pour revue, Giacinti and Giordano, 2006) ou des gènes d'inhibition de l'apoptose tel que la sérine/thréonine kinase Akt (Carpten *et al.*, 2007). Ces mutations engendrent une prolifération anarchique des cellules et un fort signal de survie donnant ainsi à la cellule son caractère « immortel ». Par la suite, la mise en place d'une néovascularisation tumorale et l'augmentation de l'angiogenèse à proximité de la tumeur, vont alors permettre le développement et la propagation de celle-ci au sein de l'organe cible (Folkman, 1971), jusqu'à le rendre non fonctionnel. De plus, dans certains cancers, la proximité des vaisseaux sanguins va également permettre aux cellules cancéreuses de circuler via les voies sanguines et de générer des métastases (Folkman, 1995). Différents types de traitement anti cancéreux ont été caractérisés, certains pour leur effets anti-angiogéniques tel que le Bevacizumab (Bonthala Wedam *et al.*, 2006), d'autres pour leur effet apoptotique comme les ligands de récepteurs de mort cellulaire (Kaufmann and Earnshaw, 2000) mais ces molécules restent à l'origine de nombreux effets secondaires du fait de leur non spécificité.

Au cours de ces dernières années, les requins ont présenté un grand intérêt dans la recherche de molécules à potentiel anti-cancéreux. En effet, leur squelette composé exclusivement de cartilage, tissu non vascularisé, fut le premier à être étudié pour ses propriétés anti-angiogéniques (Lee and Langer, 1983). Des mélanges ou des molécules à potentiel anticancéreux issues des chondrichthyens ont donc par la suite été mises en évidence de par leur propriété anti-angiogénique comme le Néovastat (AE-941), extrait de cartilage de *Sphyrna lewini* ou de *Squalus acanthias* (Lane and Hills, 1991) ou la Squalamine, aminostérol

identifié chez *Squalus acanthias* (Sills *et al.*, 1998). Ces deux produits ont fait l'objet d'études cliniques du cancer du poumon à petites cellules qui sont arrivées jusqu'au stade III pour le Néovastat (Lu *et al.*, 2010) et le stade IIA pour la squalamine (Herbst *et al.*, 2003). L'effet anti-angiogénique de la squalamine, notamment celle de la choroïde dans le cadre de la MLA, passerait par un blocage des canaux ioniques membranaires et une séquestration de la calmoduline qui entrainerait une inhibition de l'action cellulaire du VEGF (Emerson and Lauer, 2008). En dehors de ses propriétés anti-angiogéniques, la squalamine présente un effet antimicrobien de large spectre de par son action sur les membranes biologiques (Zasloff *et al.*, 2011).

Le projet Peptisan basé sur l'extraction de peptides à partir de différents organes d'un petit requin, la petite roussette *Scyliorhinus canicula*, a mis en évidence lors d'un premier criblage sur plusieurs lignées cancéreuses deux peptides (Pep12 et Pep15) à potentiel anticancéreux. Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer leur action *in vitro* et *in vivo*. La démonstration de la capacité de ces deux peptides à diminuer la viabilité de cellules issues de carcinome pulmonaire humain (Calu-6) a été investie par test WST1. Le cancer du poumon est une cible de choix car il a engendré près de 1,6 millions de décès dans le monde en 2012, soit près de 20% de la mortalité mondiale engendrée par un cancer (Ferlay *et al.*, 2015). Par la suite, des tests préliminaires ont été réalisés pour évaluer l'efficacité de Pep12 et Pep15 *in vivo* chez des souris immunodéficientes présentant une tumeur induite par xénogreffe de cellules Calu-6. Enfin, l'étude des mécanismes d'action des peptides a été initiée *in vitro* afin de déterminer leur potentiel cytostatique, apoptotique ou nécrotique. Les résultats obtenus dans cette étude préliminaire montrent le potentiel de Pep12 à diminuer la viabilité de cellules cancéreuses pulmonaires *in vitro* et une tendance à diminuer le volume tumoral *in vivo*. Cependant des écart-types trop importants ne permettent pas d'obtenir des résultats significativement différents des groupes contrôles.

Ces expériences doivent donc être réitérées avec un nombre d'individus plus important pour limiter les variations interindividuelles et confirmer le potentiel anticancéreux de ces peptides.

Matériel et méthode

Peptides

Un criblage réalisé sur différents tissus issus de la petite roussette *Scyliorhinus canicula* a mis en évidence deux peptides Pep12 (1614,66 g/mol) et Pep15 (1646,74 g/mol) issus du testicule, responsables d'une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses issues d'une lignée de carcinome pulmonaire humain (Calu-6) *in vitro*. L'analyse par blast des précurseurs de ces peptides a révélé que le précurseur de Pep12 était une protéine à motif de liaison à l'ARN et que le précurseur de Pep15 était une ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène M.

Culture cellulaire

La lignée cellulaire de carcinome pulmonaire humain Calu-6 a été obtenue chez ATCC (LGC Promochem, France). Ces cellules adhérentes ont été amplifiées dans des flasques T75 dans un milieu complet contenant du ENEM 1X avec du Earle's salt (LONZA) supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau (LONZA) et de la L-Glu à 2 mM dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ à 37°C. Les cellules ont été repiquées deux fois par semaine afin d'éviter une confluence cellulaire supérieure à 80%. Lors des différents passages, les cellules sont décollées par une trypsinisation de 5 à 10 min et réensemencées dans des flasques T75 ou d'autres support expérimentaux (plaques 24 puits). Pendant la culture en flasque, le doublement cellulaire est mesuré entre chaque passage.

Tests de viabilité cellulaire

Des expériences pour déterminer l'activité métabolique des cellules ont été réalisées par des tests Water-soluble Tetrazolium Salts (WST1). Les cellules ont étéensemencées à 14000 cellules/ml/puits dans des plaques 96 puits. Les cellules sont maintenues en culture sous forme de monocouche cellulaire pendant 24h à 37°C. Elles sont par la suite traitées en duplicat avec Pep12 ou Pep15 (1000, 100, 80, 60, 40, 20 et 10 ng/μl), le Cisplatine (CDDP) (300,01g/mol) (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} M), anticancéreux déjà présent sur le marché ou l'ammonium bicarbonate (AB) (1 ; 0.1 ; 0.08 ; 0.06 ; 0.04 ; 0.02 et 0.01%) correspondant au tampon de reprise des peptides. A 96h post traitement, la densité optique est mesurée par le Multiskan EX ThermoLabsystems à 450 et 620 nm (OD = 450-620 nm) afin de déterminer la viabilité cellulaire. L'activité anti proliférative engendrée par les substances testées est

exprimée en IC50 (concentration à laquelle est observé 50% de diminution de l'activité WST1 reflétant la prolifération cellulaire).

Contrôle de la stabilité des peptides dans les tampons

La stabilité des peptides dans les tampons de solubilisation a été évaluée en cinétique. Les peptides ont été incubés à 4°C et à température ambiante dans de l'ammonium bicarbonate 0.1N et du NaCl 0,9% à trois concentrations différentes. A T0h, T8h et T24h, 10 µl de chaque fraction (Ammonium bicarbonate et NaCl 0,9% à 4°C et température à ambiante pour chaque peptide) ont été prélevés et dilués dans un tampon de dilution (v/v). Les analyses ont été réalisées en chromatographie liquide par phase inverse suivi d'une ionisation par electrospray (ESI) en mode positif puis l'échantillon a été détecté par spectrométrie de masse (MS). Les données ont été enregistrées et analysées respectivement par les logiciels Hystar 3.2 et Quant Analysis (Bruker). Le solvant utilisé pour la séparation en HPLC se compose d'un mix d'eau et d'acétonitrile (50/50 v/v) contenant 0.1% d'acide formique. Le volume injecté d'échantillon est de 20µl en mode « full loop ». Les paramètres de MS et de la MS/MS ont été optimisés avec des solutions standards de peptide à 10µg/ml dans un mix eau/acétonitrile (50/50 v/v) contenant 0,1% d'acide formique. Pour chaque peptide la forme d'ion majoritaire en simple MS a été sélectionnée pour la fragmentation en MS/MS. Dans le but d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la méthode, le mode de surveillance de réaction multiple (MRM) a été utilisé pour des fragmentations spécifiques de chaque composé en MS/MS. Les ions filles formés en MS/MS sont utilisés pour la quantification. Les peptides se sont révélés les plus stables dans l'ammonium bicarbonate.

Test au bleu de trypan

Les cellules ont étéensemencées à 14000 cellules/ml/puits dans des plaques 24 puits. Puis elles ont été mises en culture sous forme de monocouche cellulaire dans une étuve à 37°C pendant 24h dans le milieu complet décrit précédemment. Les cellules ont par la suite reçu un traitement unique avec Pep12 ou Pep15 (respectivement 544.86 ng/µl et 425,42 ng/µl), le CDDP (4.5.10⁻⁷ M) ou de l'AB (0.1N). À 24h, 48h, 72h et 96h, les cellules ont été récupérées

après trypsinisation. Cinquante (50) μl de solution cellulaire a été mélangée à 5 μl de bleu de trypan (dilution 1 :1). Les cellules ont par la suite été comptées sur une « kova slide » et la viabilité a été estimée par le marquage au bleu de trypan.

Cytométrie en flux

Impact des peptides sur le cycle cellulaire :

Les cellules Calu-6 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits (14000 cellules/puits). Après 24h, les cellules ont été traitées en triplicat avec les différentes conditions : non traitées, AB 0.5%, CDDP ($4.5 \cdot 10^{-7}$ M), Pep12 (544.86 ng/ μl) et Pep15 (425.42 ng/ μl). Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées à T24h, T48h et T72h post traitement. A ces différents temps d'analyses, les cellules ont été dissociées avec 200 μl de trypsine à 37°C pendant 5 à 10 min, puis l'action de la trypsine a été arrêtée par ajout de milieu (1 : 1 v/v). Les solutions cellulaires ont alors été collectées, rassemblées et centrifugées 10 min à 1000 rpm. Le culot obtenu a été rincé avec du PBS froid et resuspendu dans de l'éthanol 70% et conservé à -20°C (2h minimum) jusqu'à l'analyse par le cytomètre. Le jour de l'analyse, les cellules ont été rincées avec du PBS, resuspendues dans 150 μl d'iodure de propidium (IP)/ tampon RNases et incubées 15 à 30 min. L'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant de l'ADN il permet donc de quantifier l'ADN cellulaire et de ce fait d'identifier dans quel stade du cycle cellulaire se trouve les cellules (G0/G1 (2n), S (2n-4n), G2/M (4n)). Enfin, les cellules ont été étudiées par cytométrie en flux (GALLIOS, Beckman Coulter) et les résultats ont été analysés avec le logiciel Kalusa.

Impact des peptides sur l'apoptose cellulaire :

Les cellules Calu-6 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits (14000 cellules/puits). Après 24h, les cellules sont traitées en triplicat avec les différentes conditions : non traitées, AB 0.5%, CDDP ($4.5 \cdot 10^{-7}$ M), Pep12 (544.86 ng/ μl) et Pep15 (425.42 ng/ μl). Les analyses de cytométrie de flux ont été réalisées à T24h, T48h et T72h post traitement. A ces différents temps d'analyse, les cellules ont été dissociées avec 200 μl de trypsine- EDTA (BE17-161E, lonza) à 37°C pendant 5 à 10 min, puis l'action de la trypsine a été arrêtée par ajout de milieu (1 : 1 v/v), les solutions cellulaires ont alors été prélevées, rassemblée et centrifugées. Le culot

a été rincé deux fois dans du PBS froid et resuspendu dans 40 µl d'un tampon 1X (issu du kit de détection FITC Annexin V/IP, BD Bioscience, ref 556547). Les cellules sont par la suite marquées avec de l'annexine V/ IP (5µl/tube) et incubées 15min à l'abri de la lumière. L'annexine V va se lier aux phosphatidylsérines exprimées par les cellules en apoptose. Cent vingt (120) µl de tampon 1X fournit par le kit est par la suite ajouté avant l'analyse au cytomètre (analyse faite dans un délai maximum de 1h). Les résultats sont analysés avec le logiciel Kalusa.

Etude *in vivo* sur l'effet anti tumoral des peptides

Animaux :

Quatre-vingt (80) souris femelles immunodéprimées (Hsd : Athymic Nude-Foxn1 nu/nu) de cinq semaines ont été obtenues chez Harlan (Gannat, France). L'induction tumorale a été réalisée par injection sous cutanée de cellules Calu-6 (5×10^6 cellules/ souris dans 200µl de milieu de culture sans sérum). Le volume tumoral des souris a été mesuré deux fois par semaine avec un pied à coulisse digital. Le volume tumoral a été calculé grâce à la formule ($\text{longueur} \times \text{largeur}^2$) / 2 (Bissery and Chabot, 1991).

Le tampon Ammonium bicarbonate (AB) (200mg) (Ref. 34009, Cooper) a été dissout dans 50ml d'eau afin d'obtenir une concentration à 0.1N. Cette solution a été stérilisée par filtration sur filtre 0.22µm. Les solutions peptidiques ont été réalisées par la dissolution de Pep12 et de Pep15 dans l'ammonium bicarbonate 0.1N afin d'obtenir une concentration à 20 mg/ml et 75 mg/ml. Ces différentes solutions ont par la suite été administrées à 5ml/kg. Le CDDP a été dilué dans du NaCl 0.9% pour obtenir une concentration à 4 mg/ml puis administré à 10 ml/kg. Les solutions peptidiques ainsi que la solution de CDDP ont été préparées chaque jour avant le traitement.

Dix huit (18) jours après l'induction tumorale, les souris ont été randomisées en 7 groupes en fonction du volume tumoral, les moyennes tumorales par groupe étaient comprises entre 73.0 ± 25.0 et 80.8 ± 50.3 mm³ et n'étaient pas statistiquement différentes. Les souris ont été traitées quotidiennement pendant 10 jours. Les groupes traités ont reçu par voie intraveineuse du tampon Ammonium bicarbonate 0.1 % (AB), Pep12 (20mg/kg et 75 mg/kg),

Pep15 (20 et 75 mg/kg). Le CDDP (4mg/kg) est administré à 10 ml/kg en intra péritonéal. Les souris non traitées n'ont reçu aucune administration. Un monitoring des volumes tumoraux a été réalisé deux fois par semaine afin d'estimer l'effet de Pep12 et de Pep15 sur la croissance des cellules Calu-6 *in vivo*. Le poids des souris a aussi été pris en considération pour déterminer l'impact du traitement sur le bien-être animal. En accord avec les lois éthiques (Directive Européenne 2010/63/UE) toutes les souris ayant une perte pondérale > 25% de leur poids initial, un volume tumoral > 2000 mm³ ou une tumeur nécrotique lors de l'expérimentation ont été euthanasiées.

Résultats

Pep12 et Pep15 induisent une diminution du métabolisme des cellules cancéreuses pulmonaires *in vitro*.

L'effet de Pep12 et de Pep15 sur le métabolisme des cellules issues d'un carcinome pulmonaire humain (Calu-6) a été testé par test WST-1 (Figure 28). Les concentrations inhibitrices médianes (IC50) ont été déterminées et deux tendances ont été observées. Les résultats obtenus lors de la première expérience (Figure 28A) montrent que Pep12 et Pep15 ont une IC50 de 73.7 ng/μl et 37.3 ng/μl respectivement, alors que lors de la deuxième expérience (Figure 28B) les IC50 sont de 671.4 ng/μl pour Pep12 et de 235.5 ng/μl pour Pep15. De ce fait, on peut noter une variation importante (facteur de 10) des IC50 entre les deux expériences. Les deux profils observés sont donc sûrement liés à l'état des cellules au moment du test. En effet, nous avons pu observer que l'effet anti tumoral obtenu pour les deux peptides est fortement lié au temps de doublement des cellules Calu-6, les peptides étant plus efficaces sur des temps de doublement faibles (20-30h) (Figure 28A).

Tests préliminaires de l'efficacité anti tumorale de Pep12 et Pep15 *in vivo*.

L'effet anti tumoral des peptides Pep12 et Pep15 a été testé sur la capacité des peptides à réguler la croissance tumorale chez des souris immunodéficientes (Figure 29). Des xénogreffes de cellules Calu-6 ont été réalisées sur les souris. Par la suite différents traitements ont été

administrés quotidiennement pendant 10 jours (jour 18 à jour 28) : AB 0.1N (tampon), Pep12 à 20 et 75 mg/kg et Pep15 à 20 et 75 mg/kg en iv, CDDP à 4 mg/kg en injection intrapéritonéale et enfin non traitées. Les tumeurs ont par la suite été mesurées à 5 temps différents : J18, J21, J26, J29, et J32. A J18 et J21, il n'y a pas de différence significative entre le volume tumoral des différents groupes. A J26, on observe que Pep12 à 75mg/kg, Pep12 à 20mg/kg et CDDP 4mg/kg ont tendance à engendrer une diminution du volume tumoral par rapport aux individus traités avec le tampon, cependant les résultats obtenus ne sont pas significatifs. En revanche Pep15 ne semble pas avoir d'effet. A J29 et J32, seule le cisplatine (CDDP), induit une diminution significative du volume tumoral. Cependant, certains résultats n'ont pas été inclus du fait que la perte de poids des souris traitées avec le cisplatine ait été supérieure à 25%. On peut également noter que Pep12 présente toujours une tendance à engendrer une diminution le volume tumoral par rapport aux individus traités avec le tampon cependant les écarts types dus à des variations interindividuelles importantes ne permettent pas d'obtenir des résultats significatifs. Les résultats présentés ici étant des résultats préliminaires cette forte variation interindividuelle sera donc à prendre en compte dans les prochaines expériences, en augmentant le nombre d'individus par groupe afin d'évaluer au mieux l'effet anti tumoral des peptides.

Résultats préliminaires du mode d'action de Pep12 et Pep15 in vitro, test du potentiel apoptotique/nécrotique et cytostatique des peptides.

Le mode d'action des peptides Pep12 et Pep15 a été étudié sur la capacité à inhiber la prolifération cellulaire (effet cytostatique) ou à engendrer la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose *in vitro*. L'impact des peptides sur la prolifération cellulaire a tout d'abord été estimé par comptage cellulaire (Figure 30A) et l'effet des peptides sur la viabilité cellulaire a été évalué par test au bleu de trypan (Figure 30B). Ces tests ont été réalisés en cinétique à 48h, 72h et 96h pour la prolifération et à 72h et 96h pour la viabilité. Les cellules ont été traitées avec Pep12 à 544.9 ng/ μ l et Pep15 à 425.4 ng/ μ l. Pour la première étude sur l'effet cytostatique des cellules (Figure 30A), au temps 48h, aucun effet cytostatique n'a été observé que ce soit pour Pep12, Pep15 ou CDDP. A 72h, la CDDP induit une diminution du nombre de cellules de 85% (63 148 C/puits) par rapport aux cellules non traitées (408 222 C/puits). Pep12

induit lui aussi une diminution du nombre de cellules environ 43% (117 129 C/puits) par rapport au contrôle AB (205 537 cellules/puits). Pep15 (234056 cellules/puits) ne présente pas d'effet par rapport au contrôle AB. Enfin à 96h, seul CDDP (214 333 cellules/puits) induit significativement une diminution de 52% du nombre de cellules par rapport au contrôle non traité (448 556 cellules/puits). Aucun effet n'est observé pour les peptides. Concernant les tests de viabilité cellulaire (Figure 30B), au temps 72h, on peut observer une forte diminution de 40% de la viabilité cellulaire pour les cellules traitées avec Pep12 par rapport aux cellules traitées avec l'AB. Les cellules traitées avec la CDDP présentent une légère diminution de la viabilité de 7% qui n'est pas significative. Aucun effet n'est observé pour Pep15. A 96h, aucun effet des peptides n'est observé, CDDP n'induit pas non plus une diminution de la viabilité cellulaire.

Dans un deuxième temps, une analyse plus poussée du mode d'action de Pep12 et Pep15 a été réalisé par cytométrie en flux. Ces tests ont été réalisés en cinétique à 24h, 48h et 72h sur des cellules Calu-6 traitées avec Pep12 (544.9 ng/ μ l), Pep15 (425.4 ng/ μ l), AB (0.5%) et CDDP (4,5.10⁻⁷ M). L'effet apoptotique/nécrotique des peptides a été évalué par un marquage des cellules à l'Annexine V (AV) et à l'Iodure de Propidium (IP) (Figure 31). A chaque temps de cinétique, les cellules non traitées ou traitées avec de le tampon AB 0.5% ont induit une apoptose/nécrose qui n'excède pas 16%. A 24h, Pep12 et CDDP montrent un effet apoptotique important avec une induction de la mort cellulaire respectivement de 38.5% et 38.8%. A 48h, la mortalité cellulaire dans les contrôle est inférieure à 10% mais est toujours élevée pour Pep12 et CDDP (respectivement 19.12% et 12.58% vs AB (0.5%) 6.68%). Cet effet disparaît à T72h. Aucun effet n'est observé pour le peptide Pep15 sur l'induction de la mort cellulaire aux différents temps de cinétique.

La prolifération cellulaire a été évaluée par le marquage à l'iodure de propidium de cellules Calu-6 préalablement perméabilisées (Figure 32). Au temps 24h, la quantité trop faible de cellules pour la condition contrôle AB n'a pas permis une analyse des résultats. A 48h, pour CDDP on observe une augmentation du nombre de cellules en phase G2/M (35,65%) et une diminution du nombre de cellules en phase G1/G0 (48,70%) par rapport au cellules non traitées (G2/M = 23.64% ; G0/G1 = 58.16%). Pep15 induit une augmentation moins marquée des cellules en G2/M (30.35% vs AB 23.82%) et une importante diminution du nombre de cellules en phase S (12.19% vs AB 21.72%). Aucun effet n'est observé pour Pep12. Au temps

72h, on peut noter une légère différence entre les résultats obtenus pour les cellules non traitées et les cellules traitées AB 0.5% avec une légère augmentation du nombre de cellules en phase G2/M (AB = 18.40% vs NT 15.50%) et une diminution du nombre de cellules en phase G0/G1 (AB = 60.96% vs NT = 65.85%). Les cellules traitées CDDP, Pep12 et Pep15 présentent le même effet sur le cycle cellulaire avec une augmentation du nombre de cellules en phase G2/M (respectivement 25.15%, 22.58% et 22.70% vs AB 18.40%).

Discussion

Cette étude préliminaire nous montre que Pep12 et Pep15 sont capables de diminuer la viabilité de cellules cancéreuses issues de carcinome pulmonaire *in vitro*. Deux profils d'inhibition ont été mis en évidence le premier avec des IC50 moins importants (73.7 ng/μl et 37.3 ng/μl pour Pep12 et Pep15 respectivement) que le deuxième (respectivement, 671.4 ng/μl et 235.5 ng/μl). Cette différence de profil est en corrélation avec l'expérience, la seule différence entre les expériences présentant le profil 1 ou le profil 2 étant le temps de doublement des cellules, cela a permis de mettre en évidence que Pep12 comme Pep15 étaient plus efficaces lorsque les cellules avaient un temps de doublement relativement rapide (entre 20h et 30h). Même si ce temps de doublement n'est pas directement transposable *in vivo*, en effet chez les espèces murines, le temps de doublement des tumeurs pulmonaires *in vivo* est compris entre 3 et 15 jours (Vindelov *et al.*, 1985) et chez l'homme le temps de doublement des cellules de carcinome pulmonaire se situe plutôt entre 2 et 5 mois (Kerr and Lamb, 1984), cette différence d'efficacité est néanmoins à prendre en compte lors de nos prochaines expérimentations. De plus, bien que les cellules inoculées chez les souris aient un temps de doublement d'environ 20h, les expériences réalisées *in vivo* n'ont pas montré d'effet significatif des peptides. Cependant on peut noter une tendance pour Pep12 à diminuer le volume tumoral même si ces résultats restent non significatifs en raison des écarts types importants. Il serait donc intéressant de répéter ces expériences en augmentant le nombre d'individus afin de limiter les variations interindividuelles. On peut également souligner que par rapport à l'efficacité de la CDDP, dosés à 4 mg/kg (IP), les peptides ont des efficacités faibles voire inexistantes *in vivo* malgré des doses administrées beaucoup plus importantes (20 mg/kg et 75 mg/kg (IV)). En tenant compte du fait que le mode d'administration est différent, les quantités de peptide utilisées restent nettement supérieures à certains anti

cancéreux présents sur le marché tels que Afinitor® Everolimus (10mg/jour), Alkeran® Melphalan (0.15-0.25 mg/kg/jour) ou encore Caprelsa® Vandetanib (300mg/jour) (*Les anticancéreux oraux*, 2014). Il serait donc également envisageable dans un premier temps de voir si l'on obtient une diminution importante du volume tumoral via une injection en IP et dans un deuxième temps d'administrer les peptides à des doses plus faibles afin que les doses soient adéquates pour envisager une thérapie humaine. Concernant le mode d'action des peptides, même si ces résultats restent préliminaires on peut noter que Pep12 semble provoquer la mort cellulaire *in vitro* comme observé lors des tests au bleu de trypan et de cytométrie en flux comme cela a déjà été décrit pour d'autres anti-cancéreux (for review, Safarzadeh *et al.*, 2014). En revanche, le mode d'action précis du peptide reste encore à caractériser ainsi que la durée de son action car l'effet observé à 72h lors du test bleu de trypan est observé à 24h et 48h mais pas à 72h en cytométrie en flux. Pour Pep15 on observe en cytométrie de flux que ce dernier aurait plutôt un effet cytostatique observé dès 48h post traitement avec une augmentation des cellules dans la phase G2/M du cycle cellulaire et une diminution du nombre de cellules dans la phase S comme observé pour d'autres molécules à potentiel anti cancéreux (Lu *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2015). Cet effet est conservé dans une moindre mesure à 72h et est aussi retrouvé pour Pep12.

Pour conclure, cette étude préliminaire révèle l'intérêt potentiel d'un peptide issu d'un testicule de petite roussette pour induire la mort de cellules cancéreuses issues de carcinome pulmonaire. *In vitro*, Pep12 agirait plutôt en induisant l'apoptose/nécrose de ces cellules. *In vivo* ce peptide a tendance à diminuer le volume tumoral mais ce test doit être réitéré avec de plus grands effectifs en raison des fortes variations inter-individuelles.

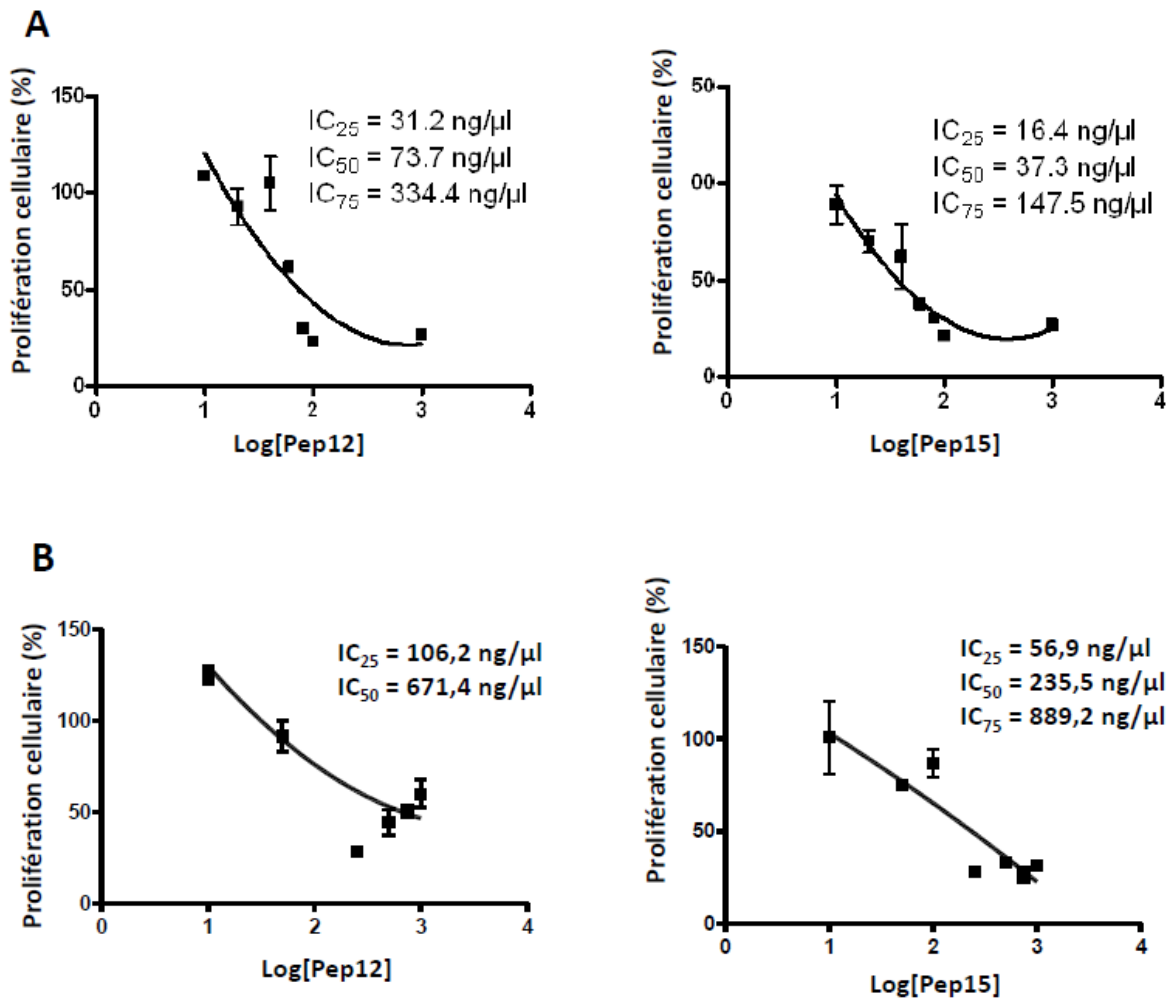


Figure 28: Pep 12 et Pep15 diminuent la viabilité des cellules cancéreuses pulmonaires *in vitro*.

L'effet des peptides sur la viabilité de cellules issues de carcinome pulmonaire humain (Calu-6) a été évalué par test WST-1. La prolifération cellulaire a été déterminée par spectrophotométrie (550nm) et rapportée en pourcentage. L'impact des peptides sur la prolifération cellulaire a été évalué en fonction de la quantité de peptide administré. La concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) ainsi que les concentrations inhibitrices 25% (IC₂₅) et 75% (IC₇₅) ont par la suite été déterminées, dans la mesure du possible, pour l'expérience 1 (A) et pour l'expérience 2 (B). L'écart type (SD) a été déterminé pour chaque point (n=3).

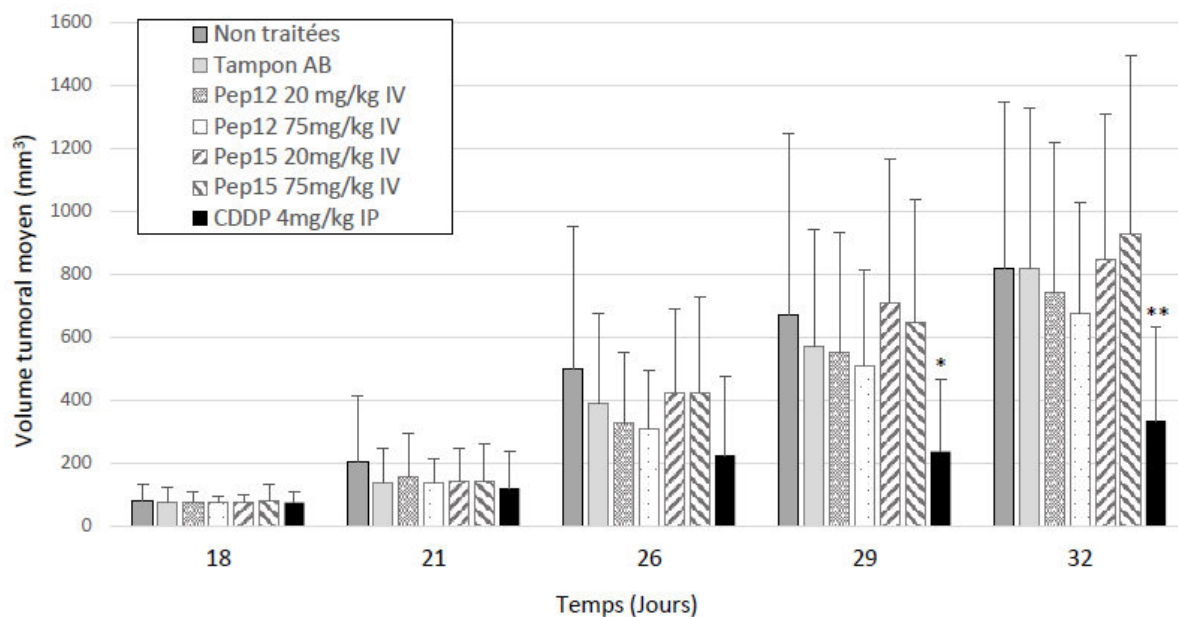


Figure 29 : Résultats préliminaires de l'effet de Pep12 et Pep15 sur la croissance tumorale *in vivo*.

L'effet de Pep12 et Pep15 sur la croissance tumorale a été évalué sur des souris immunodéficientes ayant reçu une induction tumorale avec des cellules Calu-6. Différents traitements ont alors été administrés quotidiennement pendant dix jours (J18-J28) : non traitées, Ammonium bicarbonate 0,1N, Pep12 par intraveineuse (IV) (20 ou 75 mg/kg), Pep15 par intraveineuse (IV) (20 ou 75 mg/kg) et enfin CDDP par injection intrapéritonéale (IP) (4mg/kg). La mesure des tumeurs a été réalisée en cinétique : J18 (premier jour de traitement), J21, J26, J29 et J32. Les barres d'erreurs représentent les écarts types relatifs à chaque groupe. Le test statistique utilisé est un test ANOVA à deux facteurs, * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$, le groupe CDDP est comparé au groupe non traitées et les individus traités avec les peptides (Pep12 ou Pep15) par rapport au contrôle AB. L'écart type a été déterminé pour chaque point ($n = 10$ souris par groupe).

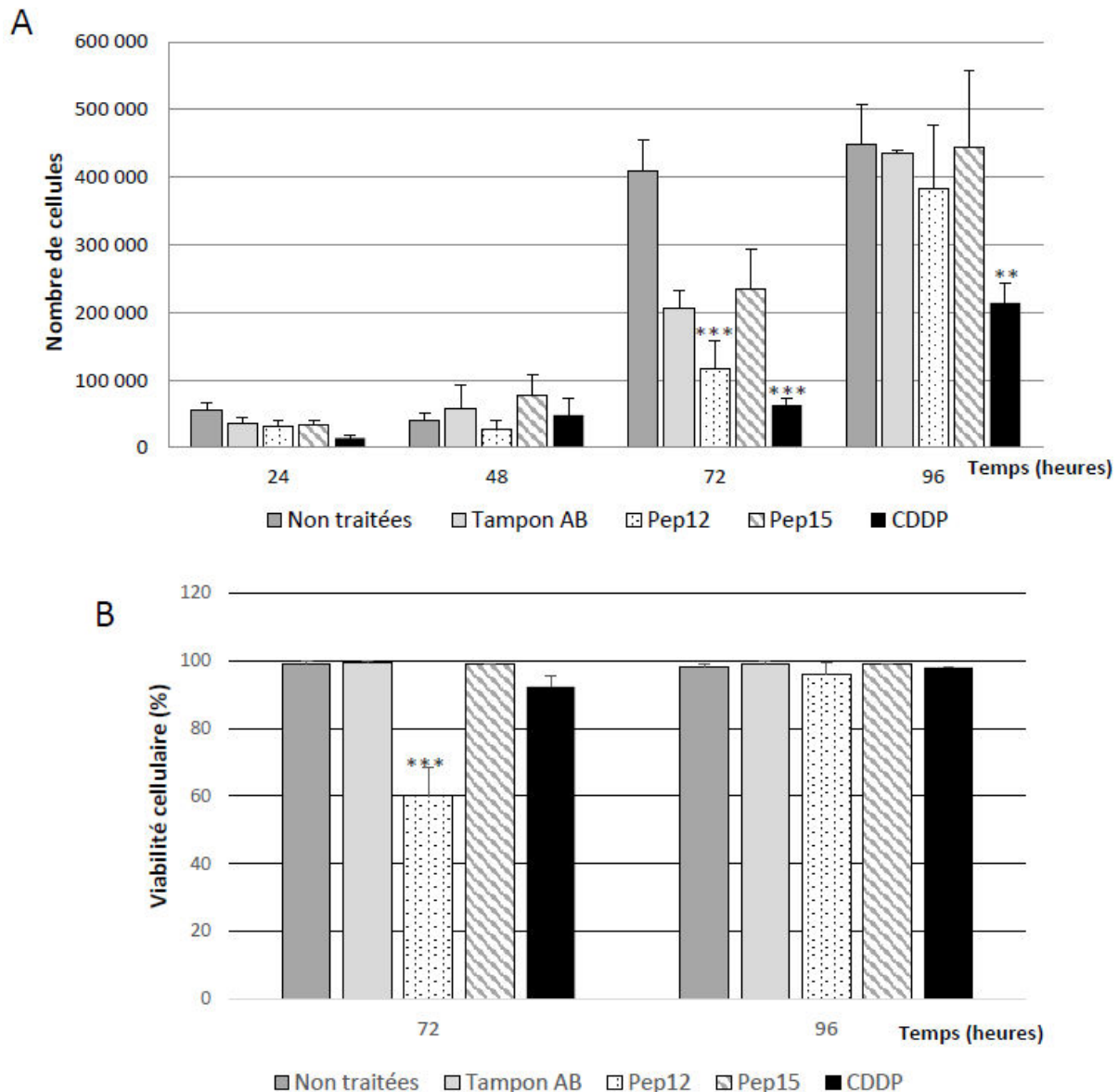


Figure 30: Résultats préliminaires de l'effet de Pep12 et Pep15 sur la prolifération (A) ou la viabilité (B) des cellules de carcinome pulmonaire humain *in vitro*.

Le potentiel cytostatique de Pep12 et Pep15 a été évalué par comptage cellulaire en cinétique à 24h, 48h, 72h et 96h post traitement sur des cellules Calu-6 (A). L'effet de Pep12 et Pep15 sur la viabilité cellulaire a été évalué par un test au bleu de trypan 72h et 96h post traitement (B). Cinq conditions ont été testées : cellules non traitées, traitées avec Ammonium Bicarbonate 0,5%, Pep12 (544,9 ng/ μ l), Pep15 (425,4 ng/ μ l) et CDDP ($4,5 \cdot 10^{-7}$ M). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts relatifs à chaque groupe. Le test statistique utilisé est un test ANOVA à deux facteurs, * : $p < 0,05$; ** ; $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$, la condition CDDP est comparée à celle des cellules non traitées et les cellules traitées avec les peptides (Pep12 ou Pep15) sont comparées à leur contrôle, les cellules traitées avec le tampon Ammonium bicarbonate. L'écart type a été déterminé pour chaque point ($n=3$).

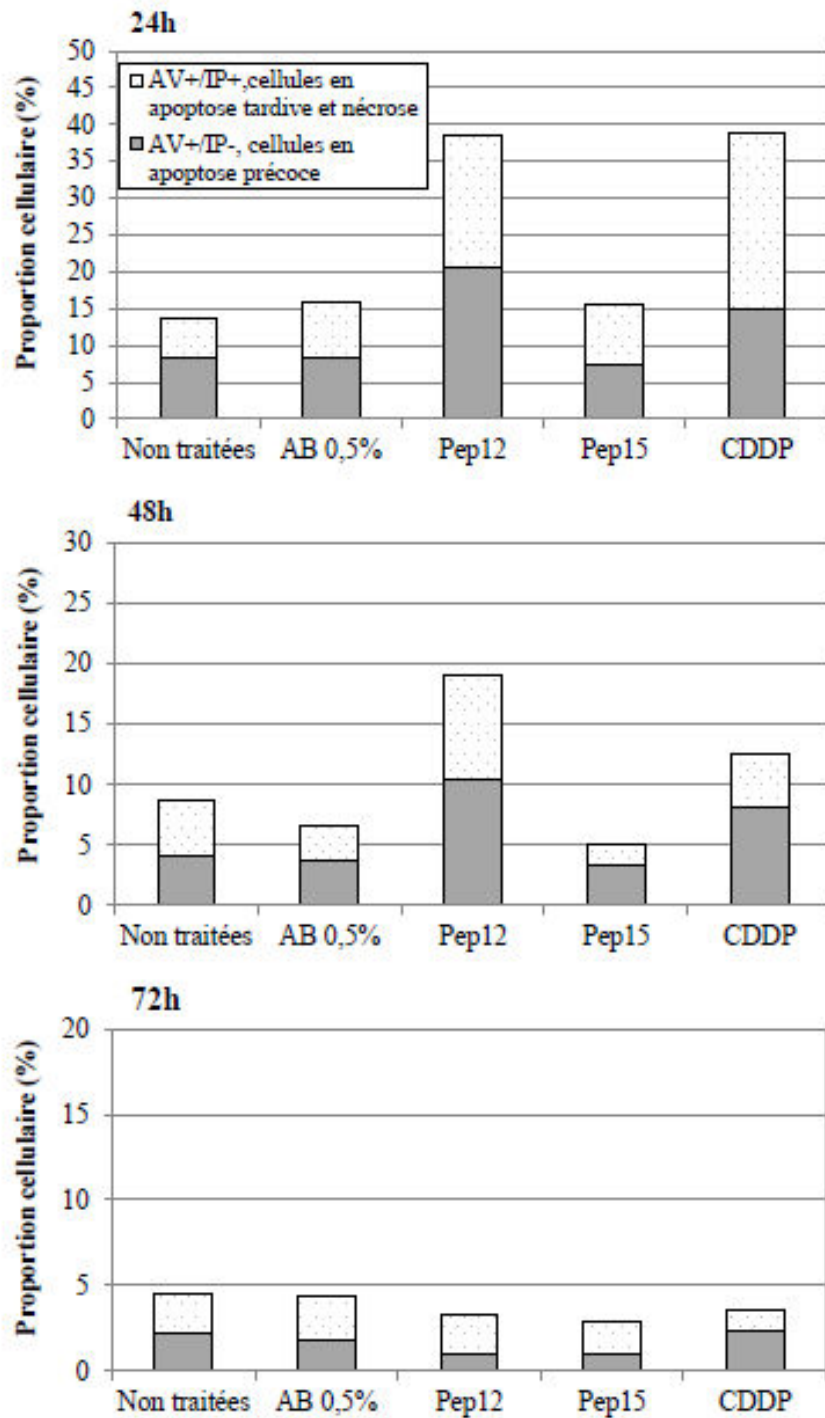


Figure 31: Résultats préliminaires du test de Pep12 et de Pep15 à induire l'apoptose ou la nécrose de cellules cancéreuses *in vitro*.

La capacité de Pep12 et Pep15 à diminuer la viabilité cellulaire des cellules Calu-6 a été évaluée par cytométrie de flux. Les cellules ont été préalablement marquées avec de l'Annexine V (AV) et de l'Iodure de Propidium (IP). Les cellules AV+/IP- sont considérées en apoptose précoce (barres grises), et les cellules AV+/IP+ sont considérées en apoptose tardive/nécrose (barres à pois). L'impact des peptides sur la viabilité cellulaire a été étudié à trois temps donnés : 24h, 48h et 72h. (n=3)

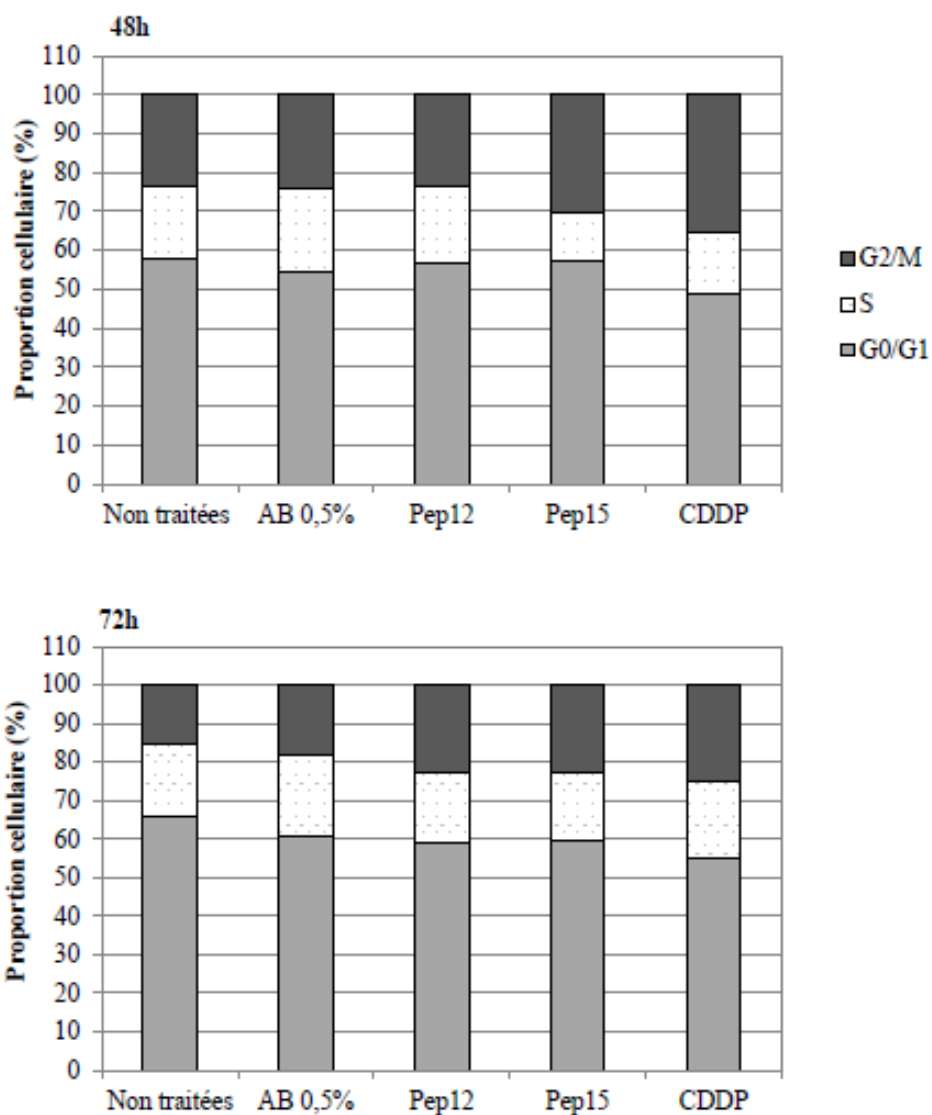


Figure 32: Tests préliminaires de l'impact de Pep12 et de Pep15 sur la prolifération cellulaire des cellules Calu-6 déterminé par cytométrie de flux.

L'impact de Pep12 et pep15 sur la prolifération cellulaire a été déterminé par cytométrie de flux à 48h et 72h post traitement. Les cellules ont été traitées avec l'ammonium bicarbonate (0,5%), Pep12 (544,9 ng/ μ l), Pep15 (425,4 ng/ μ l), CDDP ($4,5 \cdot 10^{-7}$ M) ou n'ont pas reçu de traitement. Les cellules ont été préalablement perméabilisées puis exposées à l'iodure de propidium (IP) avant l'analyse en cytométrie. L'analyse des résultats a permis de déterminer le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, phase G2/M (barres grises foncées), phase S (barres à pois) et phase G0/G1 (barres grises claires). (n=3).

Discussion

1. Des Chondrichthyens aux Tétrapodes, entre conservations et divergences.

La classe des Chondrichthyens, située à la base des Vertébrés a divergé de la classe des Ostéichthyens il y a 420 millions d'années pour former un groupe monophylétique à part, constitué exclusivement de poissons cartilagineux (Inoue *et al.*, 2010). Même si les Chondrichthyens et les Ostéichthyens sont très fréquemment rassemblés sous le nom de poisson dans le langage courant, ils présentent de nombreuses divergences. Les poissons Téléostéens, à squelette osseux, ont subi une évolution rapide générant un grand nombre d'espèces, ayant subi au moins une duplication globale de génome (Christoffels *et al.*, 2004; Jaillon *et al.*, 2004), une seconde duplication ayant également été décrite chez les Salmonidés (Allendorf and Thorgaard, 1984). De par leur position phylogénétique à la base des Vertébrés, les Chondrichthyens ont quant à eux gardé des caractères ancestraux partagés avec d'autres classes comme celle des Téléostéens mais ont également développés des caractères qui leur sont propres.

Au cours cette thèse nous avons mis en avant des ressemblances anatomiques, cellulaires et moléculaires conservées chez les Chondrichthyens et les Mammifères. Notamment, la présence d'un pancréas distinct composé des différents types cellulaires et capable de sécréter les mêmes molécules impliquées dans la régulation de la glycémie que celles des Mammifères (Kobayashi and Syed Ali, 1981; Mulley *et al.*, 2014). Au niveau de leur reproduction, contrairement à la majorité des Téléostéens et à l'exception de quelques Actinoptérygiens comme les guppys qui possèdent un gonopodium (Magurran, 2005), les Chondrichthyens ont une fécondation interne comme les Mammifères. Tous les Chondrichthyens mâles possèdent deux organes copulateurs, les ptérygopodes. Ce caractère ancestral retrouvé chez des Placodermes fossiles (Long *et al.*, 2014) a donc été maintenu chez les Chondrichthyens mais perdu chez la majorité des poissons téléostéens, les poissons téléostéens ayant donc divergé avec une fécondation externe par ovoposition puis fécondation par dépôt de sperme sur les œufs. On peut également observer chez la petite roussette la présence d'un tractus génital complexe, en effet si chez le poisson zèbre, le testicule est directement relié à la papille urogénitale par le canal déférent, chez les Chondrichthyens on retrouve une organisation plus

proche de celle observée chez les Mammifères, avec la présence de vésicules séminales, d'épididymes et de canaux efférents et déférents (Brien, 1958).

Ces caractères anatomiques et physiologiques communs, nous ont amenés au cours de cette thèse à rechercher des molécules à potentiel anti-diabétique chez *S. canicula* et ont notamment permis de mettre en exergue un peptide capable de réguler la glycémie et l'insulinémie chez des souris présentant un diabète de type 2.

Cependant d'autres mécanismes physiologiques ont également été conservés chez les Chondrichthyens. En effet, ils ont été décrits comme étant les premiers Vertébrés à avoir développé un système immunitaire adaptatif possédant des immunoglobulines de type igNAR qui ont la particularité de n'être composées que d'une seule chaîne lourde (Feige *et al.*, 2014). Le site antigénique est quant à lui formé d'un seul site de liaison appelé le vNAR qui est hautement soluble (Flajnik *et al.*, 2011). Ce site de liaison combine les fonctionnalités les plus bénéfiques des protéines; il est de petite taille, présente une importante stabilité, mais peut se coupler à ses cibles avec les avantages des anticorps classiques, et également générer des sites hautement spécifiques possédant une grande affinité (pour revue, Muyldermans, 2013). Les domaines vNAR présentent également une diversité structurale permettant une augmentation importante du nombre d'interactions avec des antigènes et ainsi une meilleure défense immunitaire de l'organisme (Stanfield *et al.*, 2004). L'analyse de la structure des igNAR montre une faible conservation des séquences primaires avec les IgG humaines, que les motifs secondaires de type IgG sont déjà présents et que les structures spécifiques aux IgNAR (domaines constants C1 à C5) sont impliquées dans la stabilité des anticorps (Feige *et al.*, 2014). De plus, la production d'immunoglobuline humaine mutée contenant des motifs conservés des IgNAR montre une augmentation de leur stabilité et sécrétion, mettant en exergue des mécanismes conservés entre les Tétrapodes et les Chondrichthyens et les possibilités d'ingénierie protéique (Feige *et al.*, 2014; Zielonka *et al.*, 2015). L'anatomie des Chondrichthyens, qui partagent des caractères à la fois morphologiques, cellulaires et moléculaires avec les Mammifères montre donc l'intérêt de ce modèle dans la recherche de molécules à des fins thérapeutiques.

Les Chondrichthyens restent cependant encore trop peu étudiés et peu de données protéomiques, transcriptomiques ou génomiques sont disponibles. L'intérêt pour cette classe, d'un point de vue évolutif mais également thérapeutique, a quand même permis ces dernières

années d'acquérir des données moléculaires avec, notamment, la publication des génomes de la raie (*Leucoraja erinacea*) (2012), de la chimère éléphant (*Callorhinchus milii*) (2013) et du requin baleine (*Rhincodon typus*) (2017). Aucun génome n'est actuellement publié pour *Scyliorhinus canicula*, seules des banques transcriptomiques sont disponibles au sein de l'équipe. La recherche par blast de molécules d'intérêt nous a néanmoins permis l'identification de quatre Nanos chez les Vertébrés, dont deux Nanos1 (Nanos1A et Nanos1B), un Nanos2 et un Nanos3. La mise à disposition du génome de requin baleine et de la raie a alors confirmé la présence des quatre formes de Nanos chez les Chondrichthyens. Par la suite, une étude de synténie a été réalisée sur un premier assemblage du génome de roussette, réalisé par le Dr. S. Mazan (Station marine de Banyuls, communication personnelle), ainsi que sur les génomes de nombreuses autres espèces. Elle a permis de mettre en évidence la duplication du gène *nanos1* en amont des Gnathostomes du fait de la présence des deux formes de *nanos1* chez les espèces les plus ancestrales des Actinoptérygiens et des Sarcoptérygiens, mais que seule l'une d'entre elles était présente chez les Amniotes (*nanos1A*) et les Téléostéens (*nanos1B*). De plus, les analyses immuno-histochimiques et par hybridation *in situ* ont également montré des différentiels d'expression de ces gènes dans le testicule, *nanos1A* étant exprimé de façon ubiquiste dans les cellules germinales alors que *nanos1B* est préférentiellement exprimé dans les cellules germinales de la zone germinative et la zone des cystes à spermatogonies différenciées. Ces analyses ont également pu mettre en exergue l'expression à la fois cytoplasmique et nucléaire de Nanos1B dans les cellules germinales testiculaires et ovariennes aux stades précoces, mais également une association de cette protéine à la chromatide lors de divisions mitotiques et méiotiques dans les stades plus tardifs. En revanche, Nanos1A est quant à lui exclusivement exprimé au niveau cytoplasmique. Ces résultats soulèvent donc la question du rôle de ces quatre Nanos dans le testicule et dans l'ovaire de petite roussette. Ont-ils une fonction redondante comme observée pour Nanos 2 et Nanos 3 chez la souris où tous deux sont impliqués dans le maintien de la lignée germinale (Tsuda *et al.*, 2003) ou au contraire ont-ils subi une spécification ? De plus, pour les poissons Téléostéens ou les Amniotes qui ont perdu une copie du gène Nanos, respectivement *nanos1A* et *nanos1B*, y a-t-il eu une compensation de la version absente par l'autre isoforme conservée de Nanos ? En effet, la redondance fonctionnelle au sein d'une même famille de molécules a déjà été mise en évidence chez différentes espèces. Par exemple pour la super-famille des récepteurs GFR α , la perte chez la grenouille de la Neurturine, ligand de GFR α 2, a induit des

changements spécifiques de ce dernier pour permettre la liaison du GDNF (classiquement associé au récepteur GFR α 1) (Hätinen *et al.*, 2007). GFR α 1 a d'ailleurs été identifié chez la roussette par analyses *in silico* et par des approches immunohistochimiques (Bosseboeuf *et al.*, 2014a) mais la présence du GDNF n'a pas, non plus, été détectée dans les banques transcriptomiques. Cependant, il a été montré que cette voie était fonctionnelle chez la roussette car l'ajout de GDNF recombinant humain augmente le taux de survie et le nombre de SSCs potentielles *in vitro* (Gautier *et al.*, 2014). La recherche de ligands de la famille du GDNF dans les banques transcriptomiques a néanmoins permis de mettre en évidence la présence de l'Artémine, autre membre de la famille des ligands GDNF qui pourrait avoir un rôle compensatoire comme observé chez la grenouille.

Enfin, à travers les différentes espèces il peut également être noté la présence de spécifications moléculaires comme observé pour SDF-1 dans notre étude. En effet, SDF-1 est présent sous une forme membranaire et sous une forme sécrétée chez *S. canicula* comme c'est également le cas chez le requin baleine et la raie mais pas chez la chimère et les Amniotes où seule la forme sécrétée est retrouvée. Ces résultats ouvrent donc un nouveau questionnement sur l'évolution de cette chimiokine chez les Vertébrés. Les deux formes de SDF-1 sont-elles issues du même gène ou comme pour Nanos, y a-t-il eu une duplication du génique ? Cette caractéristique a également été décrite dans la littérature chez la souris pour la cytokine SCF dont les deux formes, avec et sans domaine transmembranaire, sont dues à un épissage alternatif (Flanagan *et al.*, 1991). Il a été mis en évidence que chacune des formes avait son propre rôle dans la migration et la survie des cellules germinales (Gu *et al.*, 2011). Ainsi, la forme soluble à faible concentration est impliquée dans la survie alors qu'en quantité supérieure elle va permettre la motilité des cellules germinales. La forme membranaire permet quant à elle le contrôle de la balance motilité/agrégation et crée un environnement de « niche » dans lequel évoluent les cellules au cours de leur migration. Les cellules ayant quitté cette niche cessent de migrer et rentrent en apoptose. L'étude de ces deux formes de SDF-1 chez la roussette pourrait donc également mettre en évidence une spécification moléculaire absente chez les autres Vertébrés.

Afin de poursuivre la caractérisation moléculaire et évolutive des Nanos2 et 3 ainsi que celle de la chimiokine SDF-1 dans des conditions optimales, un nouveau séquençage du génome de petite roussette est envisagé en collaboration avec d'autres partenaires. Les nouvelles

techniques de séquençage étant réalisées avec des fragments d'ADN plus longs, elles permettront d'obtenir un alignement plus pertinent, limitant les erreurs d'assemblage et facilitant la synténie. Par la suite, l'étude de Nanos2 et de Nanos3 par immunohistochimie et hybridation *in situ* pourra être réalisée afin de déterminer leur profil d'expression au niveau testiculaire. Cette caractérisation est d'autant plus importante que Nanos2 est décrit comme étant un marqueur spécifique d'une sous population de spermatogonies chez la truite (Bellaïche *et al.*, 2014) et que Nanos3 est impliqué dans le maintien du caractère indifférencié des spermatogonies dans le testicule prépubère de souris (Lolicato *et al.*, 2008). L'étude de ces deux Nanos permettrait donc d'identifier deux nouveaux marqueurs de cellules souches spermatogoniales chez la petite roussette. La détermination du rôle endogène des quatre Nanos peut être également envisagée en réalisant soit des invalidations par CRISPR cas-9 ou éventuellement des *Knock Out* conditionnels via le système Cre-Lox. Sachant que Nanos est un facteur maternel présent dès la spécification des PGCs chez l'embryon de souris, l'étude des quatre Nanos au niveau embryonnaire pourrait être intéressante pour déterminer si Nanos1 est également impliqué dans la survie et la migration des PGCs chez la roussette, comme observé chez le poisson zèbre (Kopranner *et al.*, 2001). L'étude de SDF-1 au niveau embryonnaire paraît également judicieuse car en plus de son rôle dans le *homing* cellulaire, la voie SDF-1/CXCR4 a également été décrite comme impliquée dans la migration des PGCs (Takeuchi *et al.*, 2010). Chez la souris, SDF-1 est non seulement exprimé au niveau des zones où se situent les PGCs mais également tout au long de leur voie de migration, guidant ainsi les PGCs exprimant CXCR4 jusqu'aux crêtes génitales (Ara *et al.*, 2003 ; Molyneaux *et al.*, 2003). De plus, des études ont montré qu'une diminution de l'expression de SDF-1 ou de son récepteur altérerait la migration des PGCs. Plus spécifiquement, les PGCs qui ne reçoivent pas le signal SDF-1 montrent une perte des mouvements directionnels jusqu'à leur cible et se retrouvent à des positions ectopiques au sein de l'embryon (Doitsidou *et al.*, 2002). Ainsi, le marquage en co-immunohistochimie *whole mount* avec les anticorps anti-Vasa et anti-CXCR4 pourrait dans un premier temps nous permettre de déterminer à partir de quel stade les PGCs entrent en migration chez la petite roussette. Puis, dans un second temps l'injection d'un antagoniste de CXCR4, l'AMP3100, dans un embryon au stade déterminé précédemment nous permettrait d'observer si le blocage de cette voie induit une localisation ectopique des PGCs. Enfin, l'immunomarquage en *whole mount* de SDF-1 nous permettrait de visualiser le chemin de diffusion de la molécule et une hybridation *in situ* avec des sondes pouvant discriminer les

deux formes de SDF-1 nous éclairerait sur le type de cellule les exprimant. De plus, la publication du génome pourrait également permettre de réaliser des constructions GFP sous le contrôle des promoteurs Nanos ou CXCR4 afin de mieux caractériser leurs expressions chez l'adulte mais également de déterminer la localisation et les migrations des cellules qui les expriment chez l'embryon. Enfin, il serait également intéressant de déterminer si les partenaires connus de Nanos comme Pumilio qui s'associe à Nanos1 pour réguler le développement de la lignée germinale dans les embryons de drosophile (Kobayashi *et al.*, 1999) sont également présents chez les Chondrichthyens. Pour cela, des approches *in silico* pourront être menées afin d'identifier des sites d'interaction potentiels. Puis, l'interaction entre Nanos et d'autres protéines pourra être étudiée via des approches *in vitro* par co-immunolocalisation ou par FRET (Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes).

2. La transplantation pour la sauvegarde d'espèces

La transplantation de cellules souches spermatogoniales a été mise en place afin de répondre à des attentes sur des domaines aussi variés que l'aquaculture, la transgénèse ou la préservation d'espèces. Cette technique consiste à injecter des cellules germinales souches (PGCs, SSCs, spermatogonies) dans des individus receveurs au stade embryonnaire ou dans la gonade d'un individu adulte déplété de ses cellules germinales afin de déterminer si ces dernières sont capables de coloniser la gonade hôte, de proliférer et de se différencier en gamètes. Au cours de cette thèse, notre objectif a été de mettre en place un protocole de transplantation pour la toute première fois chez un Chondrichthyen afin de valider le caractère souche de SSCs potentielles.

Alors que de nombreuses études ont été menées chez les poissons Téléostéens, aucun protocole de transplantation n'a été établi chez les Chondrichthyens du fait de leur faible intérêt aquacole de par leur trait de vie avec un développement et une croissance lente ainsi qu'une maturité sexuelle tardive.

Le modèle de la petite roussette présente néanmoins de nombreux intérêts tout d'abord de par sa taille modeste (60 cm environ) et son caractère calme. De plus, même si sa maturité sexuelle n'est atteinte qu'à l'âge de 6 ans environ, Thiebold (1963) a observé les premières initiations de méiose chez la femelle dès le stade embryonnaire 31. Ainsi, si la plasticité observée chez les poissons Téléostéens (Takeuchi *et al.*, 2003a) est également avérée chez les Chondrichthyens, l'observation de la différenciation gamétique générée à partir de SSCs transplantées, peut être envisageable dès les stades embryonnaires tardifs chez la femelle. Chez les mâles, c'est peu après l'éclosion (roussettes de 10 à 11 cm) que s'organisent les premiers cystes dans la région antérieure de la gonade mais ceux-ci n'évolueront pas au-delà du stade préleptotène du fait de leur dégénérescence (Collenot, 1970). Il sera néanmoins possible d'observer assez rapidement si des spermatogonies sont issues du donneur.

Lors des essais de transplantation chez la petite roussette, nous nous sommes confrontés à de nombreuses divergences avec le protocole établi chez les poissons téléostéens. Chez ces derniers, la transplantation d'individus adultes peut être réalisée via la papille urogénitale ou

directement dans la gonade déplétée de ses cellules germinales. La déplétion est engendrée par différentes techniques comme le traitement des individus par busulfan et chauffage à 35°C (Lacerda *et al.*, 2010; 2013), la triploïdisation (Okutsu *et al.*, 2007), l'injection de morpholinos antisens *dead end* (Kawakami *et al.*, 2010), ou encore par hybridation (Wong *et al.*, 2011). Chez les roussettes juvéniles et adultes, le tractus génital est complexe, empêchant une transplantation via la papille urogénitale. Elles possèdent également une peau recouverte d'écailles placoïdes (écailles spécifiques des Chondrichthyens) qui présentent les mêmes caractéristiques anatomiques que des dents (émail, denticule) conférant à la peau son aspect rugueux et difficilement transperçable. Cette caractéristique morphologique empêche donc une transplantation par injection transcutanée dans la gonade adulte ce qui nous a amené à travailler chez l'embryon. L'étude du développement gonadique chez *S. canicula* a indiqué que le stade 27 était le plus propice à la transplantation car les premiers gonocytes étaient présents dans les ébauches gonadiques.

Par la suite l'isolement des SSCs a été réalisé. Différentes techniques d'isolement ont été décrites chez les poissons téléostéens : par densité à l'aide d'un gradient de percoll (Lacerda *et al.*, 2010), par tri cellulaire sur la base de marqueurs membranaires comme Thy1 (Reding *et al.*, 2010) ou par culture (Santos Nassif Lacerda *et al.*, 2013). Un des avantages de la petite roussette est l'obtention aisée de la zone germinative et sa mise en culture selon un protocole d'attachement différentiel (*differential plating*) des cellules somatique et germinales (Gautier *et al.* 2014) d'où des cultures enrichies en spermatogonies. De plus, l'ajout de GDNF permet d'amplifier et de maintenir les SSCs *in vitro* (Gautier *et al.* 2014), ce qui pourrait favoriser la transplantation comme cela a été montré chez la truite où la culture à court terme permet la récupération de l'intégrité membranaire des cellules à transplanter (Shikina *et al.*, 2013). Dans le cadre de notre étude, le marquage de ces SSCs potentielles s'est avéré délicat. En effet, l'utilisation du marqueur fluorescent PKH26 n'a pas permis, du fait du choc osmotique occasionné par la solution, la transplantation directe des cellules après marquage et a nécessité une remise en culture des cellules. Les conditions doivent encore être améliorées et il n'est pas exclu que cette étape de remise en culture ne soit pas en fait un avantage en permettant une sélection et une récupération des SSCs.

Même si d'autres mises au point restent encore à faire pour réussir une transplantation optimale chez *S. canicula*, sa mise en place reste un défi et pourrait s'inclure dans un

programme plus large de sauvegarde d'espèces. En effet, environ ¼ des Chondrichthyens sont considérés en voie d'extinction par l'UICN. Même si la roussette n'est pas une espèce menacée, les avancées de plus en plus prometteuses sur la transplantation inter-espèce et inter-genre présente un outil non négligeable dans le maintien de populations menacées. Les premières études de transplantation menées en intra spécifique, sur différentes espèces de poisson Téléostéens incluant le poisson zèbre, la sériole, la truite, l'esturgeon, la loche ou le tilapia du Nil ont néanmoins révélé la complexité de cette technique. En fonction des espèces, différents résultats ont été obtenus. Ainsi chez l'esturgeon la transplantation de spermatogonies et d'ovogonies a permis la colonisation des crêtes génitales ainsi que la prolifération des cellules (Pšenička *et al.*, 2015). Chez la truite ou le Tilapia du Nil, la transplantation de PGCs ou de spermatogonies a permis de générer des gamètes mâles et femelles viables, mettant en exergue une plasticité cellulaire (Takeuchi *et al.*, 2003b; Farlora *et al.*, 2014). Dans le cas de la truite, ces gamètes ont également permis de générer une descendance viable (Takeuchi *et al.*, 2003b). Des études réalisées inter-espèces et inter-genre se sont également avérées prometteuses. En 2001, Yamaha *et al.*, ont mis en place un protocole de transplantation du blastoderme inférieur, contenant les PGCs, issu d'un carassin triploïde (*Carassius langsdorfii*) se reproduisant par gynogenèse, dans le blastoderme d'un poisson rouge diploïde (*Carassius auratus*) se reproduisant par reproduction sexuée. Au stade larvaire, les PGCs du donneur ont colonisé les crêtes génitales du poisson hybride. A l'âge adulte les poissons hybrides ont été capables de produire à la fois des ovocytes de petite taille et haploïdes comme ceux du poisson rouge mais également des ovocytes de grande taille et diploïdes ou triploïdes comme ceux du donneur. Ces derniers ovocytes, après induction de la gynogenèse avec du sperme irradié, donnent des embryons dépourvus de malformations selon un pourcentage de 3,4 à 93,2 %. Les mâles chimériques sont également capables de générer du sperme haploïde mais sans que l'origine de celui-ci puisse être distinguée. D'autres études menées chez les Salmonidés ont consisté à transplanter des spermatogonies de truite *Oncorhynchus mykiss* chez des embryons mâles et femelles de saumon masu, *Oncorhynchus masou*, permettant ainsi d'obtenir respectivement du sperme et des ovocytes de truite (Okutsu *et al.*, 2007). Pour la première fois une plasticité cellulaire est donc également montrée pour une transplantation interspécifique. De plus, le croisement des gamètes a également permis de générer une descendance viable avec un taux d'éclosion de 89,5%.

Par la suite, la transplantation de spermatogonies a été menée chez des espèces appartenant à des familles taxonomiques différentes. Ainsi, la transplantation de spermatogonies issues de la sériole, *Seriola quinqueradiata*, dans des larves de 4mm de l'honnibe, *Nibea mitsukurii*, a permis d'observer la colonisation des gonades de 72 individus hôtes sur 88 individus injectés (Higuchi *et al.*, 2011). De plus, des études par immunohistochimie ont montré que les cellules transplantées étaient capables de proliférer au sein de la gonade et que les spermatogonies ont survécu jusqu'à 11 mois post-transplantation dans les individus receveurs. D'autres expériences réalisées entre des espèces taxonomiquement différentes ont également permis de mettre en évidence la différenciation des spermatogonies transplantées en spermatozoïdes capables de féconder des ovocytes des individus donneurs (Morita *et al.*, 2015). Néanmoins malgré les grandes avancées réalisées dans la transplantation de cellules germinales chez les poissons, la transplantation interspécifique entre des espèces taxonomiquement différentes n'a pas encore permis de générer à la fois des gamètes males et des gamètes femelles permettant de produire une descendance complète comme observé pour la transplantation intraspécifique ou intra-genre.

La mise en place de la transplantation interspécifique chez les Chondrichthyens pose également question du fait de la diversité des modes de reproduction chez cette classe. En effet, la petite roussette a un mode de reproduction ovipare et même si l'on retrouve parmi les espèces menacées des espèces ovipares, il existe également des Chondrichthyens ovovipares et vivipares. Il est également important de souligner que jusqu'alors, la transplantation a été menée sur des individus donneurs et receveurs phylogéniquement proches, il faudra donc étendre et optimiser ce protocole afin qu'il puisse être applicable chez d'autres requins, raies ou chimères.

De même, une grande diversité de taille est retrouvée au sein de cette classe, par exemple *Scyliorhinus canicula* mesure environ 60 cm pour 550g alors que le requin baleine *Rhincodon typus* peut mesurer plus de 20 m et peser 34 tonnes. Néanmoins, une étude de transplantation réalisée entre le thon bleu du Pacifique, qui mesure environ 3m pour 450kg, et le maquereau *Scomber japonicus* dont la taille est d'environ 30 cm pour un poids de 2,9kg, montre que la transplantation de spermatogonies de thon dans un individu de plus petite taille avec une maturité sexuelle plus précoce, permet la colonisation et la prolifération des cellules injectées dans la gonade hôte (Yazawa *et al.*, 2010).

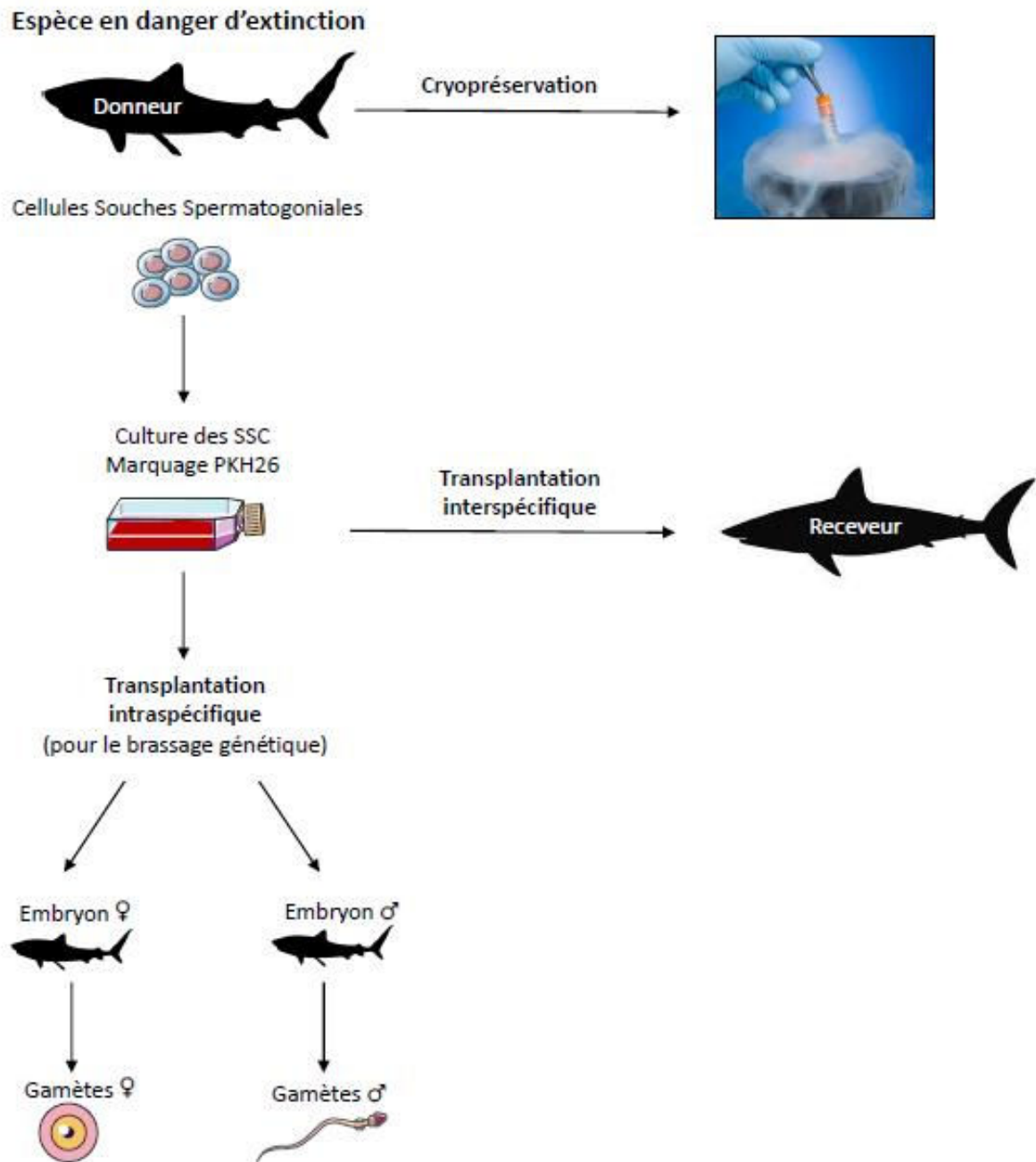


Figure 33 : Schéma représentant l'intérêt de la transplantation chez les chondrichthyens dans la sauvegarde d'espèces.

Les testicules d'un individu donneur sont prélevés puis la zone contenant les cellules souches est disséquée. Les cellules sont soit dissociées et cryopréservées soit marquées au PKH26 et mises en culture suivant le protocole établi par Gautier et al., pendant une semaine. Par la suite, les cellules sont transplantées dans des embryons mâles ou femelles d'un individu receveur de la même espèce afin d'obtenir des gamètes avec un patrimoine génétique identique à celui du donneur soit dans des espèces différentes.

La limite de cette méthode est que l'individu receveur pourra au mieux fournir des gamètes mâles et femelles mais qu'il lui sera impossible de supporter le développement d'embryons. Ainsi, la transplantation interspécifique pourrait dans un premier temps être envisagée entre la petite roussette (receveur) et la grande roussette (*Scyliorhinus stellaris*) (donneur) qui est une espèce quasi menacée d'après l'UICN possédant le même type de reproduction que la petite roussette mais étant de taille plus importante (1,25 à 1.70 m) (Figure 33).

Enfin, la caractérisation des SSCs chez la petite roussette reste néanmoins une avancée majeure dans la sauvegarde du patrimoine génétique de Chondrichthyens du fait que ces cellules peuvent être cryopréservées. Chez les poissons, les ovocytes ne peuvent pas être cryopréservés du fait de leur grande taille, de la présence d'une importante quantité de vitellus ainsi que de leur faible perméabilité membranaire aux cryoprotecteurs (Zhang *et al.*, 2007). Seuls les gamètes mâles peuvent être cryopréservés et permettre la génération d'une descendance par insémination des ovocytes (Yang *et al.*, 2012). La cryoconservation du sperme a déjà été établie chez de nombreux poissons comprenant des espèces d'eau douce telles le saumon, l'esturgeon, la carpe et le poisson chat mais également des espèces marines comme le turbot, le bar ou encore l'anguille, à la fois pour des raisons aquacoles ou de protection d'espèces (pour revue, Cabrita *et al.*, 2010). Chez la petite roussette des études préliminaires de cryopréservation de sperme ont été initiées. La cryopréservation des spermatogonies présente quant à elle un grand intérêt de par le caractère pluripotent de ces cellules. En effet, une fois transplantées dans des individus mâles ou femelles, elles peuvent générer respectivement des spermatozoïdes ou des ovocytes viables. Ainsi, Lee *et al.* (2016) ont montré chez la truite que des SSCs cryopréservées pendant cinq ans et transplantées dans des saumons receveurs femelles ou mâles permettaient de générer des ovocytes et des spermatozoïdes viables ainsi qu'une descendance présentant le patrimoine génétique de l'individu donneur. Plus intéressant encore, Lee *et al.* (2015) a également montré que des spermatogonies prélevées sur une truite congelée dans son entier pendant 3 mois pouvaient générer des gamètes mâles et femelles viables suite à une transplantation et ainsi obtenir une génération F1. Cette dernière étude est très importante car la congélation d'individus dans leur entier pourrait être mise en place lors de pêches accidentelles de Chondrichthyens en voie d'extinction, permettant ainsi d'aider à la préservation de différentes espèces.

3. Les peptides utilisés en thérapie

Les peptides sont définis comme des molécules de petite taille constituées de moins de 50 acides aminés. Ces petites molécules, hautement spécifiques au niveau de la liaison à leurs cibles, sont de plus en plus présentes sur le marché pharmaceutique du fait qu'elles engendrent peu d'effets secondaires (pour revue, Craik *et al.*, 2013). Les peptides peuvent également être utilisés dans de nombreux domaines de par leur large champ d'action en interagissant avec des hormones endogènes, des facteurs de croissance, des neurotransmetteurs, des molécules de signalisation ainsi que des agents immunologiques et de défense. Ainsi, certains ont été mis en évidence pour leur potentiel anticancéreux (pour revue, Xiao *et al.*, 2015), anti inflammatoire (Ma *et al.*, 2017), anti microbien (pour revue, Bahar and Ren, 2013) ou encore antidiabétique (pour revue, Billyard *et al.*, 2007). Cependant, leur utilisation au niveau pharmaceutique présente des limites comme une courte demi-vie systémique, une faible perméabilité membranaire et une diminution, voire une perte, de leur activité lorsqu'ils sont administré par voie orale (pour revue, Craik *et al.*, 2013). En dépit de ces désavantages, il était répertorié sur le marché pharmaceutique en 2013 plus de 100 médicaments basés sur l'administration de peptides. Parmi les plus connus utilisés chez l'homme, il peut être noté la calcitonine pour traiter l'hypercalémie et l'ostéoporose (Wisneski *et al.*, 1978; Reginster, 1993), ou encore l'ocytocine pour favoriser la contraction utérine lors de l'accouchement (pour revue, Zhang *et al.*, 2011). L'origine des peptides pour les thérapies reste diverse mais récemment un intérêt particulier a été porté sur les peptides d'origine marine (Zhu *et al.*, 2010b; Fan *et al.*, 2014). Deux peptides sont actuellement commercialisés le Ziconotide (Prialt®), issu d'escargot conique marin approuvé par la FDA en 2004 (Olivera, 2006) pour une utilisation en tant qu'analgésique et l'Adcetris® identifié chez le lièvre de mer pour le traitement de lymphomes (Senter and Sievers, 2012).

La caractérisation de peptides à potentiel thérapeutique chez la roussette nous a permis de mettre en évidence un peptide à potentiel anti-diabétique appelé Pep18. Ce peptide a montré sa capacité à induire la sécrétion d'insuline *in vitro* ainsi que son potentiel antidiabétique en régulant la glycémie de souris présentant un diabète de type 2 induit par injection de streptozotocine. Même si d'autres expériences doivent être réalisées sur des modèles de diabète de type 2 plus stables tels que les souris génétiquement modifiées ob/ob ou db/db,

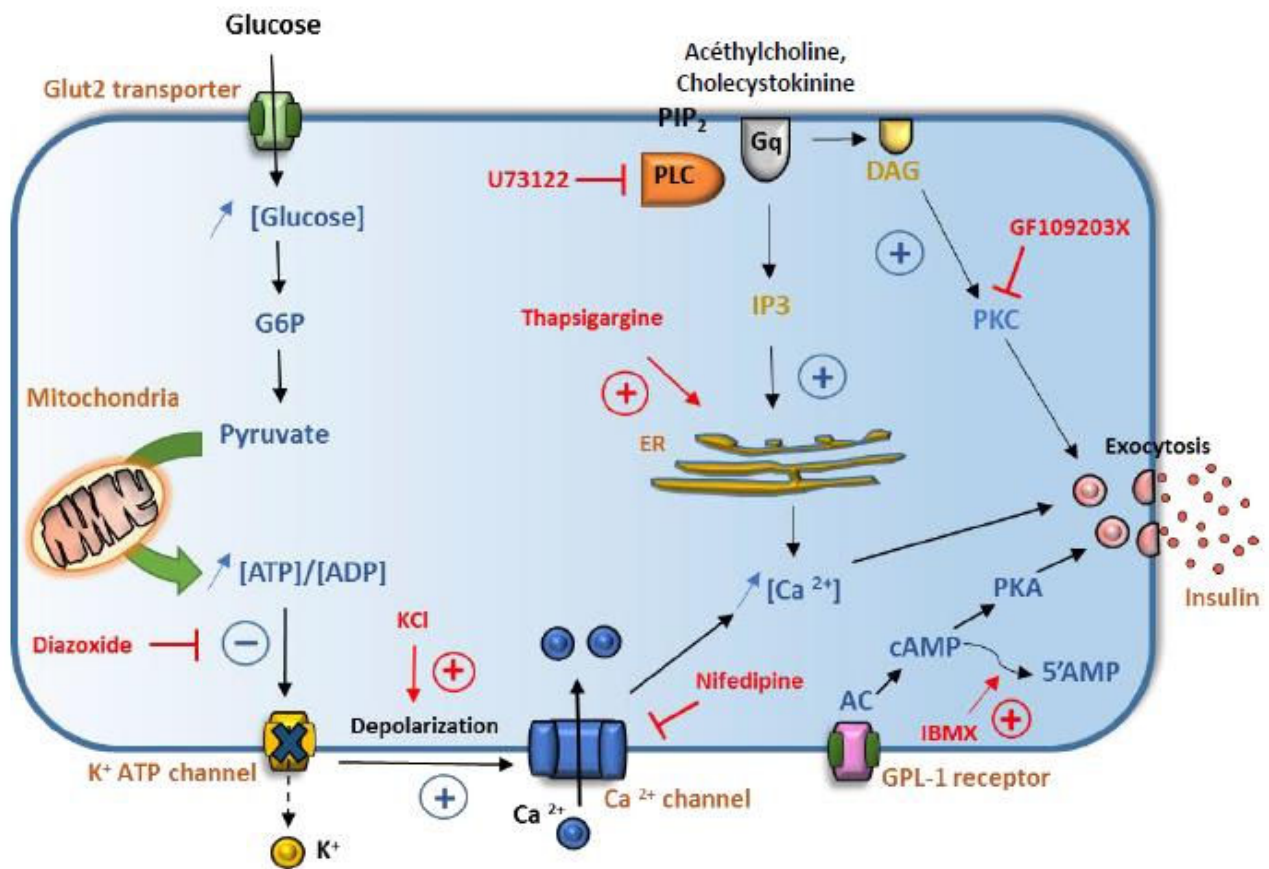


Figure 34 : Schéma des voies insulinémiques ciblées par les différentes drogues.

Ce schéma représente les trois voies majoritaires impliquées dans la sécrétion d'insuline. L'action des différentes drogues testées afin de déterminer à quel endroit agit Pep18 afin d'augmenter la sécrétion d'insuline, sont également indiquées. **ATP**= Adenosine triphosphate ; **ADP** = Adenosine biphosphate ; **G6P** = Glucose 6-phosphate ; **KCl** = Potassium chloride ; **Ca** = Calcium ; **PLC** = Phospholipase C ; **Gq** = α subunit of G protein-coupled receptor ; **PIP₂** = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; **IP₃** = Inositol-triphosphate ; **DAG** = Diacylglycérol ; **PKC** = Phosphokinase C ; **ER** = Endoplasmic Reticulum ; **GPL-1** = Glucagon-like peptide-1 ; **AC** = Adenyl cyclase ; **cAMP** = Cyclic adenosine monophosphate ; **PKA** = Phosphokinase A

ces résultats s'avèrent très prometteurs. Au cours de cette étude nous avons constaté que les souris traitées avec Pep18 ne semblaient pas présenter d'effets secondaires avérés. En effet, aucune prise ou perte pondérale notable n'a été observée alors que chez l'homme le traitement avec certains antidiabétiques comme les sulfonyles engendre dans certains cas une prise pondérale de 1 à 5kg (Philis-Tsimikas, 2009). Les souris traitées avec Pep18 ne semblent pas non plus présenter de nécrose acinaire ni de métaplasie des cellules ductales caractéristiques des pancréatites aiguës décrites chez certains patients traités avec des incrétines (Singh *et al.*, 2013). Enfin, le précurseur de Pep18 ayant été identifié au niveau testiculaire chez la petite roussette, nous avons vérifié son éventuel impact sur la spermatogenèse des souris traitées, par des observations histologiques. La spermatogenèse complète chez la souris s'effectuant en 35 jours, les souris ont été sacrifiées 35 jours post-traitement et tous les individus observés présentent une spermatogenèse complète avec des spermatozoïdes présents dans la lumière des tubes séminifères. Pep18 ne semble donc pas impacter la fertilité des individus à court terme mais des études à plus long terme doivent être envisagées.

Afin de mieux comprendre le mode d'action de Pep18 il serait intéressant d'étudier son fonctionnement au niveau cellulaire. Les nombreux antidiabétiques présents sur le marché possèdent différents modes d'action pour réguler la glycémie. Certains, comme les biguanides ou les glitazones, ne vont pas induire la sécrétion d'insuline mais vont accroître l'absorption des glucides au niveau des différents organes en augmentant notamment le nombre et/ou la sensibilité des récepteurs à l'insuline (Lord *et al.*, 1983; Kobayashi *et al.*, 1992). D'autres agissent directement sur la sécrétion d'insuline, les sulfonyles comme les glinides permettent la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendant des cellules des îlots β de Langerhans, ce qui engendre une dépolarisation membranaire responsable d'un influx calcique. L'augmentation de calcium intracellulaire induit alors la contraction des filaments de l'actomyosine responsable de l'exocytose des vésicules d'insuline (pour revue, Sola *et al.*, 2015). Les incrétines de type GPL-1, libérées suite à un apport en aliments, sont sécrétées de manière glucose dépendante et agissent en se liant au récepteur GPL-1 qui entraîne la libération de l'insuline via une augmentation de l'AMPc et du calcium intracellulaire (Kim and Egan, 2008). Une des perspectives de notre étude serait donc de déterminer à quel niveau cellulaire intervient Pep18 pour induire une sécrétion d'insuline. Les résultats obtenus *in vitro*

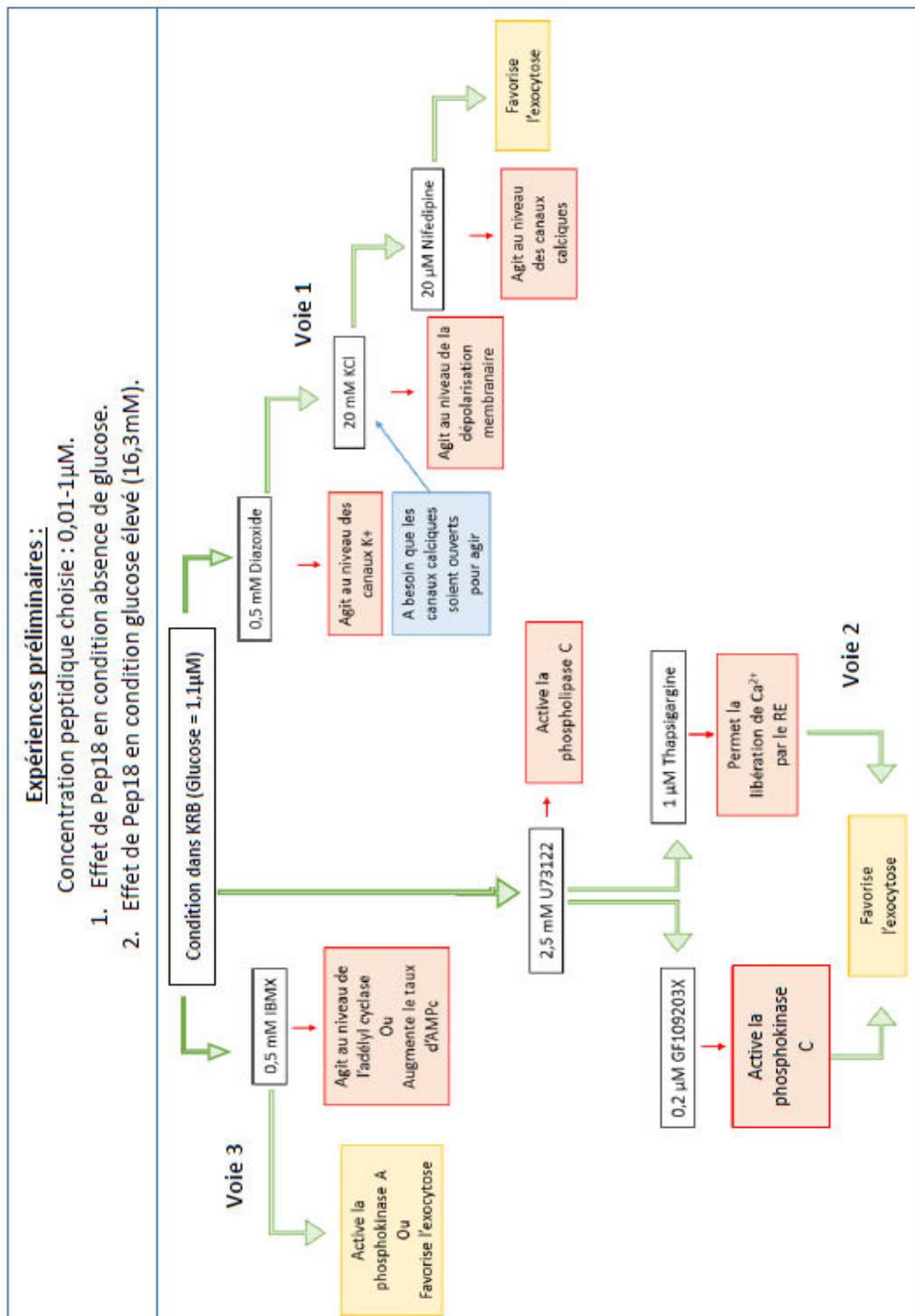


Figure 35: Protocole expérimental pour déterminer le mode d'action de Pep18.

Ce schéma représente la démarche proposée afin d'évaluer le mode d'action de Pep18 *in vitro* sur cellule β pancréatique de rat, RIN5F. Flèche verte : induit la sécrétion d'insuline, flèche rouge : n'induit pas la sécrétion d'insuline. Le schéma représente l'impact que peut avoir la drogue sur chaque voie testée, cependant lorsque la sécrétion reste effective cela n'exclut pas qu'elle soit due à l'activation d'une autre voie.

par tests ELISA sur des cellules β pancréatiques de rat, montrent que le peptide est capable d'agir directement sur ces cellules pour générer une libération d'insuline. Ainsi l'utilisation de différentes drogues permettant le blocage des voies à insuline à différents niveaux permettrait de déterminer quel facteur de la voie est impacté par Pep18 (Figure 34). L'exocytose de l'insuline peut être induite par trois voies majoritaires, la voie impliquant le récepteur Glut2 qui est glucose dépendante *in vitro* et la voie PIP₃ et celle du récepteur aux GLP-1 like peptide qui sont glucose indépendantes *in vitro*. Dans un premier temps, le peptide sera testé en absence ou en présence de glucose afin de déterminer si le peptide permettrait seulement d'amplifier la sécrétion d'insuline ou s'il serait capable à lui seul d'induire une réponse insulinémique. En fonction des résultats, différentes drogues pourront être testées, le mode d'action de chaque drogue au niveau cellulaire est présenté dans la Figure 29 et le protocole expérimental proposé est présenté en Figure 30. Si le peptide n'est effectif qu'en présence de glucose seule la voie glut2 pourra être impactée, trois drogues ont été choisies pour bloquer cette voie à différents niveaux. Le diazoxyde va agir au niveau des canaux potassiques en inhibant leur fermeture, empêchant ou limitant fortement la sécrétion d'insuline par un mode d'action de type sulfonyles. Le KCl va quant à lui induire la dépolarisation membranaire et la Nifedipine inhiber l'ouverture des canaux Ca²⁺. Si l'effet du peptide est maintenu lors de l'ajout de KCl cela va nous permettre de déterminer si Pep18 agit en induisant une dépolarisation membranaire via l'action sur un autre canal ionique comme les canaux Na⁺ également décrits dans la dépolarisation membranaire des cellules β pancréatiques (Fridlyand *et al.*, 2013). La Nifédipine va nous permettre de déterminer si Pep18 agit sur l'ouverture des canaux calciques à l'origine de l'exocytose. Enfin, si le peptide reste actif pour chacune de ces conditions on pourra supposer qu'il agit au niveau de l'exocytose à proprement parlé, favorisant le transport des vésicules ou la fusion des vésicules avec la membrane comme décrit pour certaines protéines (Xiong *et al.*, 2017). La voie PIP₃, stimulée par les récepteurs à acétylcholine et à cholécystokinine Gαq, peut être subdivisée en deux parties, une première où l'iP3 va stimuler le relargage du calcium présent dans le réticulum endoplasmique et la deuxième voie où la PKC va directement stimuler l'exocytose. La drogue U73122 engendre l'inhibition de la phospholipase C en bloquant les deux parties de la voie (Figure 35), la Thapsigargine va favoriser la libération de calcium par le réticulum endoplasmique et enfin, la GF109203X va agir sur la deuxième sous partie de cette voie en inhibant la phosphokinase C. Pour finir, la drogue envisagée pour impacter la voie GLP-1-récepteur est l'IBMX qui favorise

la transformation de l'AMP cyclique en 5'AMP, empêchant ainsi l'activation de la phosphokinase A qui permet l'exocytose. En parallèle de la détermination du rôle de Pep18, les analyses structurales de ce peptide pourraient mettre en exergue des domaines impliqués dans la régulation de la glycémie chez les Mammifères et de ce fait permettre par des blasts *in silico* l'identification d'autres peptides à potentiel antidiabétique issus d'organismes marins.

Par la suite, l'étude préliminaire réalisée sur les peptides à potentiel anti-cancéreux identifiés chez la petite roussette révèle une efficacité intéressante *in vitro* en induisant une diminution de la viabilité des cellules de carcinome pulmonaire humain pour Pep12 et un effet cytostatique sur les cellules en G2/M pour Pep15. Même si l'étude du mode d'action de ces peptides au niveau cellulaire n'a pas été entreprise au cours de cette thèse, plusieurs hypothèses peuvent être émises. L'induction de l'apoptose ou de la nécrose de cellules tumorales a déjà été observée pour des peptide anti microbiens (AMP) (pour revue, Gaspar *et al.*, 2013) dont au moins 205 d'entre eux sur les 2836 présents dans la banque de données APD (Antimicrobial Peptide Database), présentent des effets anti-cancéreux (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Ces peptides vont cibler les membranes lipidiques et leur mode d'action très rapide (quelque minute) permet de limiter la mise en place d'une réponse cellulaire pouvant être à l'origine d'une résistance au traitement (Papo and Shai, 2005). Trois modes d'action de perméabilité ont été observés en fonction des structures formées par les peptides dans la membrane et de leurs interactions avec les phospholipides. Dans le modèle en tonneau les peptides s'insèrent perpendiculairement au plan de la bicouche avec leur face hydrophile délimitant le canal du pore (Yeaman and Yount, 2003). Le deuxième modèle est en structure toroïdale où les peptides, également perpendiculaires au plan de la bicouche, provoquent une courbure de la membrane et dans ce cas, le canal du pore est délimité par une alternance de peptides et de phospholipides (Yeaman and Yount, 2003; Jenssen *et al.*, 2006). Enfin, le modèle en tapis, où les peptides sont en contact avec les têtes polaires des lipides durant tout le processus de perméabilisation, mais ne s'insèrent à aucun moment dans le cœur hydrophobe de la membrane. Leur fixation à de fortes concentrations à la surface de la membrane par des interactions électrostatiques (Shai and Oren, 2001) va alors provoquer l'effondrement de cette dernière une fois la concentration seuil atteinte, créant ainsi un effet détergent, et induisant la perforation de la membrane (Ehrenstein and Lecar, 1977). Des peptides ont également été décrits pour leur effet

cytostatique sur des cellules issues du cancer du sein comme le peptide p28 capable d'engendrer un arrêt des cellules en phase G2/M puis l'induction de l'apoptose de ces cellules (Yamada *et al.*, 2009) ou les peptides PEG-SMRwt-CLU qui induisent un arrêt des cellules en phase G2/M (Huang *et al.*, 2017). Dans ce dernier cas, en plus de bloquer les cellules dans le cycle cellulaire, le peptide induit un blocage du relargage de l'exosome tumoral empêchant ainsi la propagation des métastases cancéreuses. Cependant, le mode d'action précis des peptides pour induire ces arrêts en G2/M n'a pas encore été mis en évidence. Dans notre étude nous avons pu observer que l'effet obtenu pour Pep12 et Pep15 *in vitro* n'était pas maintenu *in vivo*. Les peptides peuvent être dégradés *in vivo* par l'action de protéases, des changements de salinité, ou encore des changements d'acidité. De par leur faible taille, ils sont également éliminés par filtration hépatique et/ou rénale. Afin de pallier à ces inconvénients, différentes approches ont été élaborées pour stabiliser les peptides pour des administrations *in vivo*. Parmi elles, le changement de certains acides aminés de configuration -L par des acides aminés de configuration-D permet de modifier les liaisons peptidiques ciblées par les protéases (Navab *et al.*, 2002). La stabilisation des peptides peut être également réalisée par cyclisation ou par ajout d'une acétylation en N-terminal (Leone-Bay *et al.*, 1995). Enfin les peptides peuvent être encapsulés pour limiter leur dégradation par hydrolyse ou par des enzymes protéolytiques (pour revue, Bruno *et al.*, 2014). Différents types d'encapsulation ont actuellement été décrites mais celle qui a plus particulièrement retenu notre attention est l'encapsulation dans des nanoparticules de glycol-chitosan car elle présente peu de toxicité pour l'organisme (Wang *et al.*, 2011). Elle facilite le passage des peptides à travers les jonctions serrées des cellules de l'intestin (Sarmiento *et al.*, 2007) et elle a également été décrite pour permettre un meilleur adressage des molécules encapsulées au niveau tumoral (Lee *et al.*, 2014). Dans un premier temps, il serait intéressant de poursuivre l'analyse de la nécrose/apoptose induite par Pep12 par des expériences de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) ou par la détermination de l'activation des voies caspases. Puis dans un deuxième temps d'envisager une encapsulation de ce peptide pour une administration *in vivo* afin d'augmenter sa stabilité systémique.

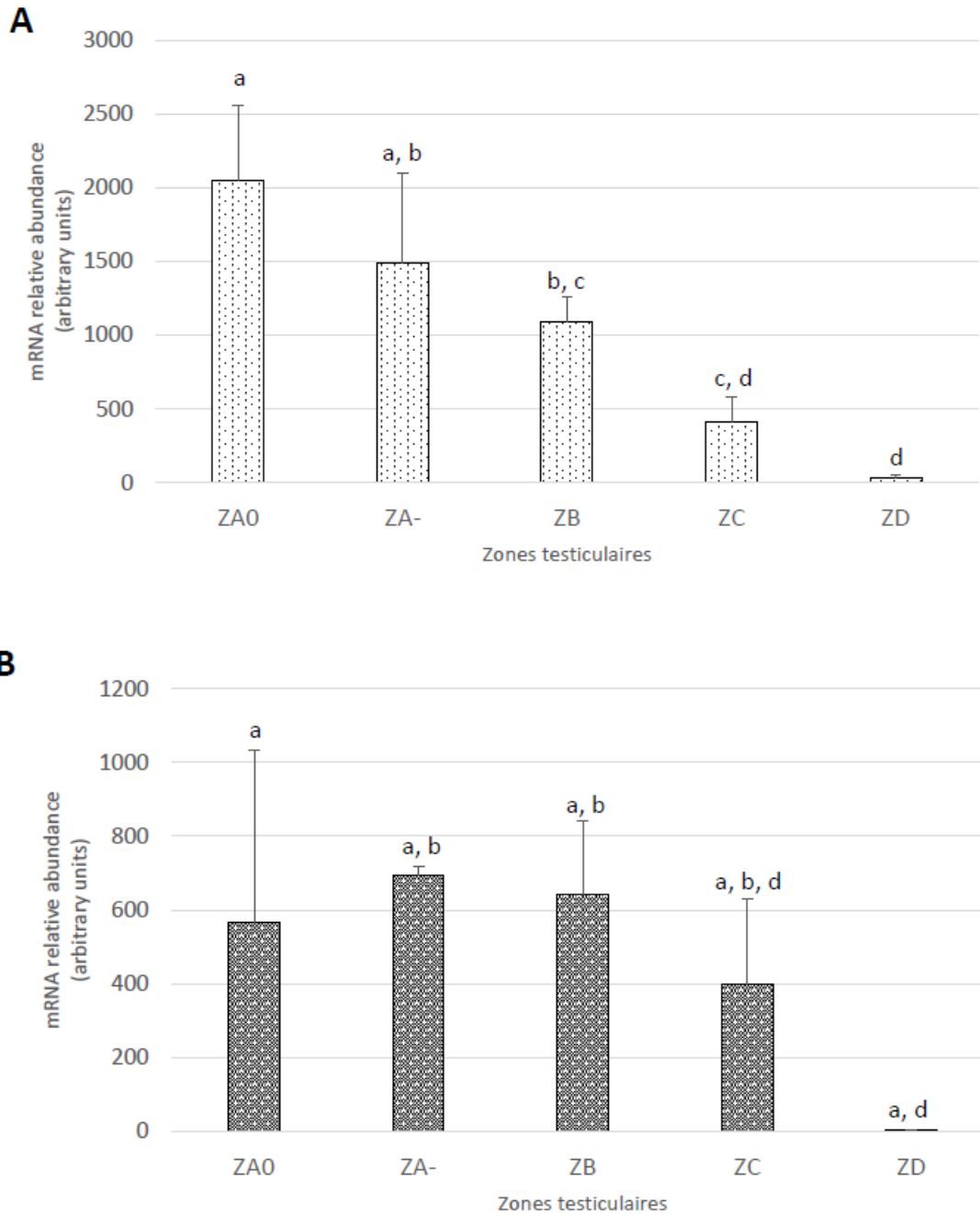


Figure 36 : Expression du précurseur de Pep12 et de Pep15 dans le testicule de *S. canicula*.

Analyse par qPCR de l'expression du précurseur de Pep12 (pPep12) (**A**) et Pep15 (pPep15) (**B**) dans les différentes zones testiculaires (A0, A-, B, C et D). **A** pPep12 est préférentiellement exprimé dans la zone A0 puis son expression décroît progressivement dans les zones A-, B et C pour n'être presque plus détectable dans la zone D. **B** pPep15 est quant à lui exprimé de façon ubiquiste dans les différentes zones mais présente une tendance à être moins exprimé dans la zone D. Les analyses statistiques ont été réalisées par intervalle de confiance, la différence entre chaque groupe correspond à P-value < 0,05%.

L'étude de ces peptides en endogène a été également initiée. Les précurseurs de Pep12 (pPep12), Pep15 (pPep15) et Pep18 (pPep18) ont, tous les trois, été identifiés dans le testicule. Pour mieux comprendre leur fonctionnement, la détermination de leur profil d'expression au niveau testiculaire a été entreprise par RT-qPCR (Figure 36 et 37). Les ARNm de pPep 18 et pPep 12 sont retrouvés en concentrations plus élevées dans la zone A0 puis, diminuent légèrement dans les zones A-, B et C pour enfin ne plus être détectables dans la zone D. Le précurseur de Pep15 présente quant à lui un profil d'expression plus ubiquiste au niveau testiculaire à l'exception de la zone D, où il n'est plus détectable. Ces profils d'expression au sein du testicule suggèrent donc un rôle pour ces deux peptides en début de spermatogenèse.

Actuellement, peu d'études ont montré l'implication de peptides au sein de la niche germinale. Néanmoins, chez la drosophile des peptides de type insuline-like dérivés du cerveau ont montré leur capacité à stimuler la prolifération des cellules germinales souches (LaFever and Drummond- Barbosa, 2005). De plus, la voie de signalisation de l'insuline joue également un rôle dans le maintien de la niche de l'ovaire chez la Drosophile en maintenant le nombre des cellules de la coiffe via la voie Notch (Song *et al.*, 2007) et en favorisant l'association des cellules de la coiffe aux cellules germinales souches via la E-cahérine (Hsu and Drummond-Barbosa, 2011). Au vu des résultats obtenus pour Pep18 *in vitro* et *in vivo*, nous pouvons penser qu'il pourrait jouer un rôle similaire à celui des peptides insuline-like de type GLP1, soulevant l'hypothèse de l'implication de Pep18 dans un mécanisme cellulaire insulino-dépendant au sein du testicule chez *S. canicula*. Le précurseur du peptide Pep12, présentant un potentiel anti-cancéreux, a été identifié dans les zones contenant les cellules souches et les spermatogonies chez la petite roussette. Il est aujourd'hui bien connu que les SSCs et les spermatogonies partagent des caractéristiques communes avec les cellules cancéreuses impliquant des voies de régulation cellulaire similaires (Wnt, Shh ou Notch) (Reya *et al.*, 2001) ainsi que la présence de récepteurs membranaires identiques (Kim and Ryu, 2017). De plus, le processus d'apoptose a été décrit pour de nombreuses fonctions au niveau testiculaire comprenant le maintien du nombre approprié de cellules germinales par rapport aux cellules de Sertoli, l'induction de la mort de cellules germinales défectives ou encore le maintien de la qualité du sperme (Shukla *et al.*, 2012). De plus chez le requin *Squalus acanthias*, il a été décrit une zone comprenant plusieurs couches de cellules germinales en dégénérescence située à la transition spermatogonie-spermatocytes (McClusky, 2005).

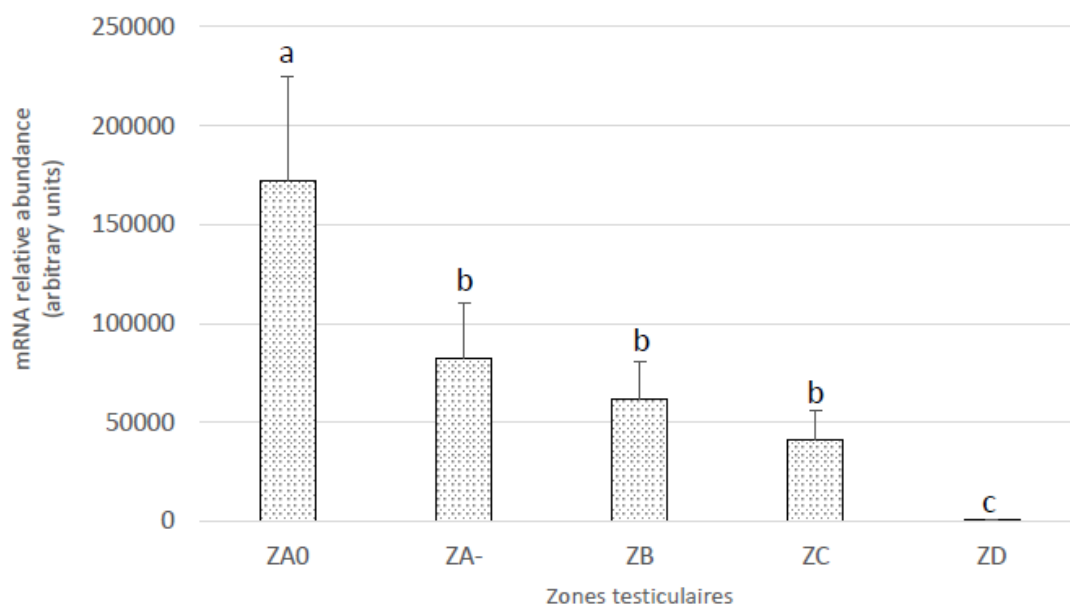


Figure 37 : Expression du précurseur de Pep18 dans le testicule de *S. canicula*.

Analyse par qPCR de l'expression du précurseur de Pep18 (pPep18) dans les différentes zones testiculaires (A0, A-, B, C et D). pPep18 est fortement exprimé dans la zone A0. Son expression décroît par la suite dans les zones A-, B et C pour n'être presque plus détectable dans la zone D. Les analyses statistiques ont été réalisées par intervalle de confiance, la différence entre chaque groupe correspond à P-value < 0,05%,

La présence d'un peptide à potentiel apoptotique dans les zones A0 et A- chez la petite roussette soulève donc l'hypothèse de l'implication de Pep12 dans la régulation de la production de sperme chez *S. canicula*. Des approches d'hybridation *in situ* permettront de préciser les types cellulaires exprimant les précurseurs des peptides et des tests *in vitro* pourront être menés afin de déterminer l'impact des peptides sur la prolifération, la mort ou le maintien des cellules germinales chez la roussette. Ces résultats ouvrent donc de nouvelles perspectives de travail dans la caractérisation de la niche germinale chez ce petit requin et montre l'intérêt des organismes marins dans la recherche de molécules à potentiel thérapeutique.

En conclusion, cette thèse a mis en évidence l'importance de la petite roussette et des Chondrichthyens en général, dans l'étude évolutive des Vertébrés. Leur position phylogénétique, à la divergence des Ostéichthyens, en fait des modèles de choix du fait qu'ils aient gardé à la fois des caractères ancestraux retrouvés chez les Tétrapodes, mais également qu'ils aient subi leur propre évolution, révélant des caractères morphologiques et moléculaires qui leur sont propres. Ces travaux ont par la suite permis l'initiation de la mise en place de la transplantation pour la toute première fois chez un Chondrichthyen et laissent donc entrevoir une perspective de préservation de cette classe qui compte à nos jours plus d'un quart d'espèces en voie de disparition. Enfin, l'intérêt de cette thèse repose également dans la mise en évidence de peptides à potentiel antidiabétique et anticancéreux qui souligne l'intérêt des organismes aquatiques dans la recherche pharmaceutique.

Bibliographie

-A-

- Aiyama Y, Tsunekawa N, Kishi K, Kawasumi M, Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M and Kanai Y** (2015) A Niche for GFR α 1-Positive Spermatogonia in the Terminal Segments of the Seminiferous Tubules in Hamster Testes. *STEM CELLS* **33** 2811–2824.
- Allendorf FW and Thorgaard GH** (1984) Tetraploidy and the Evolution of Salmonid Fishes. In *Evolutionary Genetics of Fishes*. (ed. B.J. Turner), pp. 1–46. Plenum, New York.
- Altman E, Yango P, Moustafa R, Smith JF, Klatsky PC and Tran ND** (2014) Characterization of human spermatogonial stem cell markers in fetal, pediatric, and adult testicular tissues. *Reproduction* **148** 417–427.
- Anderson WG, Ali MF, Rg I, Einarsdó E, Schäffer L, Hazon N and Conlon JM** (2002) Purification, Characterization, and Biological Activity of Insulins from the Spotted Dogfish, *Scyliorhinus canicula*, and the Hammerhead Shark, *Sphyrna lewini*. *General and Comparative Endocrinology* **126**, 113-122 (2002)
- Arnold K, Sarkar A, Yram MA, Polo JM, Bronson R, Sengupta S, Seandel M, Geijssen N and Hochedlinger K** (2011) Sox2+ Adult Stem and Progenitor Cells Are Important for Tissue Regeneration and Survival of Mice. *Cell Stem Cell* **9** 317–329.
- Awruch CA** (2016) Reproduction strategies. In *Physiology of Elasmobranch Fishes*, pp 255–310.
- Azizi H, Conrad S, Hinz U, Asgari B, Nanus D, Peterziel H, Hajizadeh Moghaddam A, Baharvand H and Skutella T** (2016) Derivation of Pluripotent Cells from Mouse SSCs Seems to Be Age Dependent. *Stem Cells International* **2016** 1–13.

-B-

- Bahar A and Ren D** (2013) Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* **6** 1543–1575.
- Bai Y, Feng M, Liu S, Wei H, Li L, Zhang X, Shen C, Zhang S and Ma N** (2016) Differential gene expression in mouse spermatogonial stem cells and embryonic stem cells. *International Journal of Molecular Medicine* **38** 423–432.
- Ballard WW, Mellinger J and Lechenault H** (1993) A Series of Normal Stages for Development of *Scyliorhinus canicula*, the Lesser Spotted Dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae). *The Journal of Experimental Zoology* **336** 318–336.
- Barckmann B and Simonelig M** (2013) Control of maternal mRNA stability in germ cells and early embryos ☆ *Biochimica et Biophysica Acta* **1829** 714–724.
- Batlouni SR, Romagosa E and Borella MI** (2006) The reproductive cycle of male catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the germinal epithelium An approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction Science* **96** 116–132.
- Beer RL and Draper BW** (2013) nanos3 maintains germline stem cells and expression of the conserved germline stem cell gene nanos2 in the zebrafish ovary. *Developmental Biology* **374** 308–318.
- Bellaiche J, Lareyre J, Cauty C, Yano A, Allemand I and Gac F Le** (2014) Spermatogonial Stem Cell

Quest : nanos2 , Marker of a Subpopulation of Undifferentiated A Spermatogonia in Trout Testis
1. *Biology of Reproduction* **90** 1–14.

Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang Y, Charter SJ, Laurent LC, Ryder OA et al. (2011) Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature America* 1–5.

Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN and Bhatia M (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunology* **2** 172–180.

Billyard T, McTernan P and Kumar S (2007) Potential therapies based on antidiabetic peptides. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **21** 641–655.

Bissery MC and Chabot GG (1991) [History and new development of screening and evaluation methods of anticancer drugs used in vivo and in vitro]. *Bulletin Du Cancer* **78** 587–602.

Blaser H, Eisenbeiss S, Neumann M, Reichman-fried M, Thisse B, Thisse C, Raz E and Raz E (2005) Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. *Journal of Cell* **118** 4027–4038.

Bonthala Wedam S, Low JA, Yang SA, Chow CK, Choyke P, Doshi A, Thomasson D, Mccarthy N, Koeppe H, Sherman M et al. (2006) Antiangiogenic and Antitumor Effects of Bevacizumab in Patients With Inflammatory and Locally Advanced Breast Cancer. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* **24** 769–777.

Bosseboeuf A, Gautier A, Auvray P, Mazan S and Sourdain P (2014) Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L .). *Reproduction* **147** 125–139.

Bowles J, Schepers G and Koopman P (2000) Phylogeny of the SOX Family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators. *Developmental Biology* **227** 239–255.

Braat AK, Zandbergen T, Water SVANDE and Goos HJTH (1999) Characterization of Zebrafish Primordial Germ Cells : Morphology and Early Distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics* **167** 153–167.

Brien P (1958) *Guide de Travaux Pratiques de Zoologie*.

Brimble SN, Sherrer ES, Uhl EW, Wang E, Kelly S, Merrill Jr. AH, Robins AJ and Schulz TC (2007) The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency. *Stem Cells* **25** 54–62.

Brinster RL and Zimmermann JW (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Developmental Biology* **91** 11298–11302.

Bruno BJ, Miller GD and Lim CS (2014) Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *National Institutes of Health* **4** 1443–1467.

Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG and Braun RE (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature Genetics* **36** 647–652.

Buta C, David R, Dressel R, Emgård M, Fuchs C, Gross U, Healy L, Hescheler J, Kolar R, Martin U et al. (2013) Reconsidering pluripotency tests: Do we still need teratoma assays? *Stem Cell Research* **11** 552–562.

-C-

Cabrera M, Gomez N, Lenicov FR, Echeverría E, Shayo C, Moglioni A, Fernandez N and Davio C (2015) G2 / M Cell Cycle Arrest and Tumor Selective Apoptosis of Acute Leukemia Cells by a Promising Benzophenone Thiosemicarbazone Compound. *PLoS ONE* 1–21.

Cabrera E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cereales S and Herráez MP (2010) Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* **26** 623–635.

Cadigan KM and Nusse R (1997) Wnt signaling : a common theme in animal development. *Genes & Development* **11** 3286–3305.

Carpén JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S et al. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448** 439–445.

Chambers I and Tomlinson SR (2009) The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* **136** 2311–2322.

Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, Vrana J, Jones K, Grotewold L and Smith A (2007) Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450** 1230–1234.

Chen S and Liu Y (2014) Regulation of Spermatogonial Stem Cell Self-renewal and Spermatocyte Meiosis by Sertoli Cell Signaling. *Reproduction* **149** R159–R167.

Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao G, Arber S, Kurpios N, Murphy TL et al. (2005) ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* **436** 1030–1034.

Chen D, Wu Z, Luo L, Huang X, Qian W, Wang H, Li S and Liu J (2015) E-cadherin maintains the activity of neural stem cells and inhibits the migration. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **8** 14247–14251.

Cheng CY and Mruk DD (2012) The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacological Reviews* **64** 16–64.

Chiarini-Garcia H and Russell LD (2002) Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction* **123** 567–577.

Chiarini-Garcia H, Raymer AM and Russell LD (2003) Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* **126** 669–680.

Christoffels A, Koh EGL, Chia J, Brenner S, Aparicio S and Venkatesh B (2004) Fugu Genome Analysis Provides Evidence for a Whole-Genome Duplication Early During the Evolution of Ray-Finned Fishes. *Molecular Biology and Evolution* **21** 1146–1151.

Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, Lendahl U and Frisén J (2000) Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells. *Science* **288** 1660–1664.

- Collenot G** (1970) Apparition et évolution de l'activité endocrine du testicule de *S. canicula* L. *Ann. Embryol. Morphog.* **2** 461–477.
- Compagno LJV** (1984) *Vol.4. Sharks of the World An Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date. Part 2. Carcharhiniformes.* p351_360
- Compagno LJV** (1990) Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes* **28** 33–75.
- Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring H-J, Mattheus U, Mack A et al.** (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* **456** 344–349.
- Costa GMJ, Avelar GF, Rezende-Neto J V, Campos-junior PHA, Lacerda SMSN, Andrade BSC, Gruppi Thomé R, Hofmann M and Franca LR** (2012) Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. *PLoS ONE* **7** 1–13.
- Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ and Pandolfi PP** (2004) Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics* **36** 653–659.
- Craik DJ, Fairlie DP, Liras S and Price D** (2013) The Future of Peptide-based Drugs. *Chemical Biology & Drug Design* **81** 136–147.

-D-

- Dann CT, Alvarado AL, Molyneux L a, Denard BS, Garbers DL and Porteus MH** (2008) Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires OCT4, a Factor Downregulated During Retinoic Acid-Induced Differentiation. *Stem Cells* **26** 2928–2937.
- Davenport IR, Weaver AL and Wourms JP** (2011) A Novel Set of Structures Within the Elasmobranch , Ovarian Follicle. *Journal of Morphology* **272** 557–565.
- Daynac M, Morizur L, Kortulewski T, Gauthier LR, Ruat M, Mouthon M-A and Boussin FD** (2015) Cell Sorting of Neural Stem and Progenitor Cells from the Adult Mouse Subventricular Zone and Live-imaging of their Cell Cycle Dynamics. *Journal of Visualized Experiments* 7–11.
- Daynac M, Tirou L, Faure H, Mouthon M-A, Gauthier LR, Hahn H, Boussin FD and Ruat M** (2016) Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone. *Stem Cell Reports* **7** 735–748.
- DeFalco T, Potter SJ, Williams A V., Waller B, Kan MJ and Capel B** (2015) Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell Reports* **12** 1107–1119.
- Demarco RS, Eikenes AH, Haglund K and Jones DL** (2015) Investigating Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *National Institutes of Health* **68** 218–227.
- DiNardo S, Tran J and Brenner TJ** (2000) Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. *Nature* **407** 754–757.
- Ding L, Yan G, Ge Q, Yu F, Zhao X, Diao Z, Wang Z, Yang Z, Sun H and Hu Y** (2011) FSH acts on the proliferation of type A spermatogonia via Nur77 that increases GDNF expression in the Sertoli cells. *FEBS Letters* **585** 2437–2444.

Dobson S and Dodd J. (1977a) Endocrine Histological after Partial in the Dogfish *Scyliorhinus canicula* L. Histological and Ultrastructural Changes in the Testis after a partial Hypophysectomy (Ventral Lobectomy). *General and Comparative Endocrinology* **32** 53–71.

Dobson S and Dodd J. (1977b) Endocrine control of the testis in the Dogfish *Scyliorhinus canicula* L. I . Effects Hormonal Control of the Testis in the Dogfish *Scyliorhinus canicula* L . of Partial Hypophysectomy on Gravimetric , and Biochemical Aspects of Testis Function. *General and Comparative Endocrinology* **32** 41–52.

Doitsidou M, Reichman-fried M, Stebler J, Köprunner M, Dörries J, Meyer D, Esguerra C V, Leung T and Raz E (2002) Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1. *Cell* **111** 647–659.

Dood J., Dood M. and Dungan R. (1983) Control of reproduction in elasmobranchs fishes. In *Control Processes in Fish Physiology*.p 221-274

Dulvy NK, Fowler SL, Musick JA, Cavanagh RD, Kyne M, Harrison LR, Carlson JK, Davidson LNK and Sonja V (2014) Extinction risk and conservation of the world ' s sharks and rays. *eLife* 1–34.

-E-

Eckardt S, McLaughlin KJ and Willenbring H (2011) Mouse chimeras as a system to investigate development, cell and tissue function, disease mechanisms and organ regeneration. *Cell Cycle* 2091–2099.

Ehrenstein G and Lecar H (1977) Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics* **10** 1.

Ellis J. and Shackley S. (1997) The reproductive biology of *Scyliorhinus canicula* in the Bristol Channel, UK. *Journal of Fish* **51** 361–372.

Emerson MV and Lauer AK (2008) Current and emerging therapies for the treatment of age-related macular degeneration. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* **2** 377–388.

Evans M. and Kaufman M. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292** 154–156.

Extavour CG and Akam M (2003) Mechanisms of germ cell specification across the metazoans : epigenesis and preformation. *Development* **130** 5869–5884.

-F-

Fan X, Bai L, Zhu L, Yang L and Zhang X (2014) Marine Algae-Derived Bioactive Peptides for Human Nutrition and Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 9211–9222.

Farlora R, Hattori-Ihara S, Takeuchi Y, Hayashi M, Octavera A, Alimuddin and Yoshizaki G (2014) Intraperitoneal Germ Cell Transplantation in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Biotechnology* **16** 309–320.

Farrell ED, Mariani S and Clarke M. (2010) Reproductive biology of the starry smooth-hound shark

Mustelus asterias : geographic variation and implications for sustainable exploitation. *Journal of Fish Biology* 1–22.

Feige MJ, Grawert MA, Marcinowski M, Hennig J, Behnke J, Auslander D, Herold EM, Peschek J, Castro CD, Flajnik M et al. (2014) The structural analysis of shark IgNAR antibodies reveals evolutionary principles of immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111** 8155–8160.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* **136** 359–386.

Fishelson L, Delarea Y and Gon O (2006) Testis structure , spermatogenesis , spermatocytogenesis , and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae , Perciformes). *Anatomy and Embryology Journal* **211** 31–46.

Fitzpatrick J., Kempster R., Daly-Engel T., Collin S. and Evans J. (2013) Assessing the potential for post-copulatory sexual selection in elasmobranchs. *National Institutes of Health* **80**.

Flajnik MF and Ruffelt L. (2000) The Immune System of Cartilaginous Fish. In *Current Topics Inj Microbiology and Immunology*, pp 249–270.

Flajnik MF, Deschacht N and Muyldermans S (2011) A Case Of Convergence: Why Did a Simple Alternative to Canonical Antibodies Arise in Sharks and Camels? *PLoS Biology* **9** e1001120.

Flanagan JG, Chan DC and Leder P (1991) Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* **64** 1025–1035.

Folkman J (1971) Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *The New England Journal of Medecin* **18** 1182–1186.

Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medecine* **1** 27–31.

Foulley M and Mellinger J (1980) Etude chronologique , structurale et biométrique de l'œuf et de son développement chez la petite roussette (*Scyliorhinus canicula*) élevée en eau de mer artificielle. *Reproduction Nutrition and Development* **20** 1835–1848.

França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC and Griswold MD (2016) The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* **4** 189–212.

Fridlyand LE, Jacobson DA and Philipson LH (2013) Ion channels and regulation of insulin secretion in human β -cells. *Islets* **5** 1–15.

Fuchs E, Tumber T and Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell* **116** 769–778.

-G-

Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW and Perlingeiro RCR (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* **109** 1743–1751.

Gao C, Kong NR and Chai L (2011) The role of stem cell factor SALL4 in leukemogenesis. *Critical*

Reviews in Oncogenesis **16** 117–127.

Gaspar D, Veiga AS and Castanho MARB (2013) From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology* **4** 1–16.

Gautier A, Bosseboeuf A, Auvray P and Sourdain P (2014) Maintenance of Potential Spermatogonial Stem Cells In Vitro by GDNF Treatment in a Chondrichthyan Model (*Scyliorhinus canicula* L .) 1. *Biology of Reproduction* **91** 1–15.

Gavis ER, Chatterjee S, Ford NR and Wolff LJ (2008) Dispensability of nanos mRNA localization for abdominal patterning but not for germ cell development. *Mechanisms of Development* **125** 81–90.

George M (2009) An annotated checklist of North Sea cartilaginous fish species. *Journal of Applied Ichthyology* 33–39.

Ghieh F, Jurjus R, Ibrahim A, Geagea AG, Daouk H, Baba B El, Chams S, Matar M, Zein W and Jurjus A (2015) The Use of Stem Cells in Burn Wound Healing : A Review. *BioMed Research International* **2015** 1–9.

Giacinti C and Giordano A (2006) RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25** 5220–5227.

Ginsberg JP (2011) New advances in fertility preservation for pediatric cancer patients. *Current Opinion in Pediatrics* **23** 9–13.

Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, Hoffmann RG, Jacobsen SJ, Marmont AM, McGlave PB et al. (1988) Bone Marrow Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase Increased Risk for Relapse Associated with T-Cell Depletion. *Annals of Internal Medicine* **108** 806–814.

Golestaneh N, Beauchamp E, Fallen S, Kokkinaki M, Uren A and Dym M (2009) Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction* **138** 151–162.

Gomez C, Chua W, Miremadi A, Quist S, Headon DJ and Watt FM (2013) The Interfollicular Epidermis of Adult Mouse Tail Comprises Two distinct Cell Lineages that Are Differentially Regulated by Wnt, Edaradd, and Lrig1. **1** 19–27.

Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM and Carrell DT (2006) Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse , hamster, pig ,and human). *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* **3** 1–9.

Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani MA and Wylie C (2011) Membrane-Bound Steel Factor Maintains a High Local Concentration for Mouse Primordial Germ Cell Motility, and Defines the Region of Their Migration. *PLoS ONE* **6** e25984.

-H-

Hahnel ANNC, Rappolee DA, Millan JL, Manes T, Carol A, Theodosiou NG, Werb Z, Pedersen RA and Gilbert A (1990) Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development* **110** 555–564.

Haraguchi S, Tsuda M, Kitajima S and Sasaoka Y (2003) nanos1 : a mouse nanos gene expressed in

the central nervous system is dispensable for normal development. *Mechanisms of Development* **120** 721–731.

Hashimoto H, Hara K, Hishiki A, Kawaguchi S, Shichijo N, Nakamura K, Unzai S, Tamaru Y, Shimizu T and Sato M (2010) Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. *EMBO Reports* **11** 848–853.

Hätinen T, Holm L and Airaksinen MS (2007) Loss of neurturin in frog—Comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Molecular and Cellular Neuroscience* **34** 155–167.

He Z, Jiang J, Hofmann M-C and Dym M (2007) Gfra1 Silencing in Mouse Spermatogonial Stem Cells Results in Their Differentiation Via the Inactivation of RET Tyrosine Kinase1. *Biology of Reproduction* **77** 723–733.

Heidstra R and Sabatini S (2014) Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15** 301–312.

Henderson AC and Casey Á (2001) Reproduction and growth in the lesser-spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* (Elasmobranchii ; Scyliorhinidae), from the west coast of Ireland. *Cahiers de Biologie Marine* **42** 397–405.

Herbst RS, Hammond LA, Carbone DP, Tran HT, Holroyd KJ, Desai A, Williams JI, Bekele BN, Hait H, Allgood V et al. (2003) A phase I/IIA trial of continuous five-day infusion of squalamine lactate (MSI-1256F) plus carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **9** 4108–4115.

Higuchi K, Takeuchi Y, Miwa M, Yamamoto Y, Tsunemoto K and Yoshizaki G (2011) Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. *Fisheries Science* **77** 69–77.

Hima Bindu A and Srilatha B (2011) Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *Stem Cell Research & Therapy* **1** 1–6.

Ho M-Y, Yu AL and Yu J (2016) Glycosphingolipid dynamics in human embryonic stem cell and cancer: their characterization and biomedical implications. *Glycoconjugate Journal* **34** 765–777

Holstein A (1969) On the problem of the local control of the spermatogenesis of the spiny dogfish (*Squalus acanthias* L.). *Zeitschrift Fur Zellforsch und Mikroskopische Anat* **93** 265–281.

Hong Y, Liu T, Zhao H, Xu H, Wang W, Liu R, Chen T, Deng J and Gui J (2004) Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101** 8011–8016.

Hornsey DJ (1978) Permeability coefficients of the egg-case membrane of *Scyliorhinus canicula* L. *Specialia* 1596–1597.

Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov D V., Blaser H, Raz E, Moens CB et al. (2007) A Role for Piwi and piRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish. *Cell* **129** 69–82.

Hsu H-J and Drummond-Barbosa D (2011) Insulin signals control the competence of the *Drosophila* female germline stem cell niche to respond to Notch ligands. *Developmental Biology* **350** 290–300.

Huang Y-H, Chin C-C, Ho H-N, Chou C-K, Shen C-N, Kuo H-C, Wu T-J, Wu Y-C, Hung Y-C, Chang C-C et al. (2009) Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1- dependent pathway. *The FASEB Journal* **23** 2076–2087.

Huang Y, Liang P, Liu D, Huang J and Songyang Z (2014) Telomere regulation in pluripotent stem cells. *Protein & Cell* **5** 194–202.

Huang M-B, Gonzalez RR, Lillard J and Bond VC (2017) Secretion modification region-derived peptide blocks exosome release and mediates cell cycle arrest in breast cancer cells. *Oncotarget* **8** 11302–11315.

-I-

Inoue JG, Miya M, Lam K, Tay BH, Danks JA, Bell J, Walker TI and Venkatesh B (2010) Evolutionary Origin and Phylogeny of the Modern Holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes): A mitogenomic perspective. *Molecular Biology and Evolution* **27** 2576–2586.

Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S and Shinohara T (2012) FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development and Stem Cells* **139** 1734–1743.

Itskovitz-eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Amit M, Soreq H and Benvenisty N (2000) Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. *Molecular Medicine* **6** 88–95.

Ivory P, Jeal F and Nolan CP (2004) Age Determination , Growth and Reproduction in the Lesser-spotted Dogfish , *Scyliorhinus canicula* (L .). *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* **35** 89–106.

-J-

Jaillon O, Aury J-M, Brunet F, Petit J-L, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A et al. (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431** 946–957.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW and Burt RW (2011) Hereditary and Familial Colon Cancer. *National Institutes of Health* **138** 2044–2058.

Jauch R, Ng CKL, Saikatendu KS, Stevens RC and Kolatkar PR (2008) Crystal Structure and DNA Binding of the Homeodomain of the Stem Cell Transcription Factor Nanog. *Journal of Molecular Biology* **376** 758–770.

Jenssen H, Hamill P and Hancock REW (2006) Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **19** 491–511.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK and Tilly JL (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **430** 145–151.

-K-

- Kalani MYS, Cheshier SH, Cord BJ, Bababeygy SR, Vogel H, Weissman IL, Palmer TD and Nusse R** (2008) Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105** 16970–16975.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki HM, Takehashi M, Toyokuni S, Shinkai Y et al.** (2005) Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development* **132** 4155–4163.
- Kanatsu-Shinohara M, Takehashi M, Takashima S, Lee J, Morimoto H, Chuma S, Raducanu A, Nakatsuji N, Fässler R and Shinohara T** (2008a) Homing of Mouse Spermatogonial Stem Cells to Germline Niche Depends on β 1-Integrin. *Cell Stem Cell* **3** 533–542.
- Kanatsu-Shinohara M, Takehashi M, Takashima S, Lee J and Morimoto H** (2008b) Homing of Mouse Spermatogonial Stem Cells to Germline Niche Depends on β 1-Integrin. *Cell Stem Cell* **3** 533–542.
- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Takashima S, Takehashi M, Ogonuki N, Morimoto H, Nagasawa T, Ogura A and Shinohara T** (2012) Reconstitution of Mouse Spermatogonial Stem Cell Niches in Culture. *Cell Stem Cell* **11** 567–578.
- Kassmer SH and Krause DS** (2013) Very small embryonic-like cells: Biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues. *Molecular Reproduction and Development* **80** 677–690.
- Kaufmann SH and Earnshaw WC** (2000) Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Experimental Cell Research* **256** 42–49.
- Kawakami Y, Goto-Kazeto R, Saito T, Fujimoto T, Higaki S, Takahashi Y, Arai K and Yamaha E** (2010) Generation of germ-line chimera zebrafish using primordial germ cells isolated from cultured blastomeres and cryopreserved embryoids. *The International Journal of Developmental Biology* **54** 1491–1499.
- Kawase E, Wong MD, Ding BC and Xie T** (2004) Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the Drosophila testis. *Development* **131** 1365–1375.
- Kerr KM and Lamb D** (1984) Actual growth rate and tumour cell proliferation in human pulmonary neoplasms. *British Journal of Cancer* **50** 343–349.
- Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB and Fuller M** (2001) Stem Cell Self-Renewal Specified by JAK-STAT Activation in Response to a Support Cell Cue. *Science* **294** 2542–2546.
- Kim S and Belmonte JCI** (2011) Pluripotency of male germline stem cells. *Molecules and Cells* **32** 113–121.
- Kim W and Egan JM** (2008) The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacological Reviews* **60** 470–512.
- Kim W-T and Ryu CJ** (2017) Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Reports* **50** 285–298.
- Klemm JD and Pabo CO** (1996) Oct-1 POU domain-DNA interactions: cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage. *Genes & Development* **10** 27–36.
- Knaut H, Pelegri F, Bohmann K, Schwarz H and Nüsslein-Volhard C** (2000) Zebrafish vasa RNA but

- Not Its Protein Is a Component of the Germ Plasm and Segregates Asymmetrically before Germline Specification. *The Journal of Cell Biology* **149** 875–888.
- Kobayashi K and Syed Ali S** (1981) Cell Types of the Endocrine Pancreas in the Shark *Scyliorhinus stellaris* as Revealed by Correlative Light and Electron Microscopy*. *Cell Tissue Res* **215** 475–490.
- Kobayashi M, Iwanishi M, Egawa K and Shigeta Y** (1992) Pioglitazone increases insulin sensitivity by activating insulin receptor kinase. *Diabetes* **41** 476–483.
- Kobayashi S, Asaoka-Taguchi M, Yamada M, Nakamura A and Hanyu K** (1999) Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nature Cell Biology* **1** 431–437.
- Kokkinaki M, Lee T-L, He Z, Jiang J, Golestaneh N, Hofmann M-C, Chan W-Y and Dym M** (2009) The Molecular Signature of Spermatogonial Stem/Progenitor Cells in the 6-Day-Old Mouse Testis1. *Biology of Reproduction* **80** 707–717.
- Kokkinaki M, Djourabtchi A and Golestaneh N** (2011) Long-term Culture of Human SSEA-4 Positive Spermatogonial Stem Cells (SSCs). *Journal of Stem Cell Research & Therapy* **01**.
- Koprunner M, Thisse C, Thisse B and Raz E** (2001) A zebrafish nanos -related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes & Development* **15** 2877–2885.
- Koprunner M, Thisse C, Thisse B and Raz E** (2016) A zebrafish nanos -related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes & Development* **15** 2877–2885.
- Kormanik GA** (1993) Ionic and osmotic environment of developing elasmobranch embryos. *Environmental Biology of Fishes* **38** 233–240.
- Kostereva N and Hofmann M-C** (2008) Regulation of the Spermatogonial Stem Cell Niche. *National Institutes of Health* **43** 386–392.
- Kousteni V, Kontopoulou M and Megalofonou P** (2010) Sexual maturity and fecundity of *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus , 1758) in the Aegean Sea. *Marine Biology Research* **6** 390–398.
- Krebsbach PH and Villa-diaz LG** (2017) The Role of Integrin $\alpha 6$ (CD49f) in Stem Cells : More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells and Development* 1–10.
- Krieger T and Simons BD** (2015) Dynamic stem cell heterogeneity. *Development* **142** 1396–1406.
- Kubota H, Avarbock MR and Brinster RL** (2004) Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101** 16489–16494.
- Kucia M, Reza R, Campbell FR, Majka M, Ratajczak J and Ratajczak MZ** (2006) A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺ SSEA-1⁺ Oct-4⁺ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* **20** 857–869.
- Kusz-Zamelczyk K, Sajek M, Spik A, Glazar R, Piotr J, Latos-biele A, Kotecki M and Pawelczyk L** (2013) Mutations of NANOS1 , a human homologue of the *Drosophila* morphogen , are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-astheno- teratozoospermia. *Journal of Medical Genetics* **50** 187–193.

- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Costa GMJ, Segatelli TM, Quirino BR, Queiroz BM, Kalapothakis E and França LR** (2010) A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish : The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. *PLoS ONE* **5** 1–9.
- LaFever L and Drummond- Barbosa D** (2005) Direct Control of Germline Stem Cell Division and Cyst Growth by Neural Insulin in *Drosophila*. *Science* **309** 1071–1073.
- Lai F, Singh A and King M Lou** (2012) *Xenopus* Nanos1 is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells. *Development* **139** 1476–1486.
- Lalit PA, Hei DJ, Raval AN and Kamp TJ** (2014) iPS Cells for Post-myocardial Infarction Repair: Remarkable Opportunities and Challenges. *National Institutes of Health* **114** 1328–1345.
- Lane IW and Hills S** (1991) Method of and dosage unit for inhibiting angiogenesis or vascularization in an animal using shark cartilage. U.S. Patent Dec. 24, 1991 Sheet 1 to 5
- Lapidot T and Kollet O** (2002) The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD / SCID and NOD / SCID / B2m null mice. *Nature Publishing Group* **16** 1992–2003.
- Larijani B, Esfahani EN, Amini P, Nikbin B, Alimoghaddam K, Amiri S, Malekzadeh R, Yazdi NM, Ghodsi M, Dowlati Y et al.** (2012) Stem Cell Therapy in Treatment of Different Diseases. *Acta Medica Iranica* **50** 79–96.
- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CVE, Korving JPWFM and Hogan BLM** (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & Development* **13** 424–436.
- Leal MC, Cardoso ER, Nobrega RH, Batlouni SR, Bogerd J, França LR and Schulz RW** (2009) Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations 1. *Biology of Reproduction* **81** 177–187.
- Lee A and Langer R** (1983) Shark cartilage contains inhibitors of tumors angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* **221** 1185–1187.
- Lee SJ, Min HS, Ku SH, Son S, Kwon IC, Kim SH and Kim K** (2014) Tumor-targeting glycol chitosan nanoparticles as a platform delivery carrier in cancer diagnosis and therapy. *Nanomedicine* **9** 1697–1713.
- Lee S, Seki S, Katayama N and Yoshizaki G** (2015) Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. *Scientific Reports* **5** 16045.
- Lee S, Iwasaki Y and Yoshizaki G** (2016) Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. *Cryobiology* **73** 286–290.
- Leone-Bay A, Santiago N, Achan D, Chaudhary K, DeMorin F, Falzarano L, Haas S, Kalbag S, Kaplan D, Leipold H et al.** (1995) N-Acylated .alpha.-Amino Acids as Novel Oral Delivery Agents for Proteins. *Journal of Medicinal Chemistry* **38** 4263–4269.
- Les anticancéreux oraux** (2014).
- Li L and Xie T** (2005) Stem Cell Niche : Structure and Function. *Annual Review of Cell and*

Developmental Biology 605–634.

- Li M, Zhu F, Li Z, Hong N and Hong Y** (2016) Dazl is a critical player for primordial germ cell formation in medaka. *Scientific Reports* 1–7.
- Lim JJ, Seol DW, Choi KH, Shin DH, Kim HJ, Song S and Lee DR** (2014) Spermatogonial stem cell enrichment using simple grafting of testis and in vitro cultivation. *Scientific Reports* 4 1–10.
- Ling F, Kang B and Sun X** (2014) *Id Proteins : Small Molecules , Mighty Regulators*. In : Current Topics in Developmental Biology **110** 189-216.
- Linn DE, Yang X, Sun F, Xie Y, Chen H, Jiang R, Chen H, Chumsri S, Burger AM and Qiu Y** (2010) A Role for OCT4 in Tumor Initiation of Drug-Resistant Prostate Cancer Cells. *Genes & Cancer* **1** 908–916.
- Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J et al.** (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* **38** 431–440.
- Loir M and Sourdain P** (1994) *Testes Cells : Isolation and Culture*. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Ed. by P.W. HOCHACHKA and T.P. MOMMSEN. Vol 3: Analytical Techniques, pp 249-272.
- Loir M, Sourdain P, Mendis-handagama SMLC and Jégou B** (1995) Cell-Cell Interactions in the Testis of Teleosts and Elasmobranchs. *Microscopy Research and Technique* **32** 533–552.
- Lolicato F, Marino R, Paola M, Pellegrini M, Dolci S, Geremia R and Grimaldi P** (2008) Potential role of Nanos3 in maintaining the undifferentiated spermatogonia population. *Developmental Biology* **313** 725–738.
- Long JA, Mark-Kurik E, Johanson Z, Lee MSY, Young GC, Min Z, Ahlberg PE, Newman M, Jones R, Blaauwen J den et al.** (2014) Copulation in antiarch placoderms and the origin of gnathostome internal fertilization. *Nature* **517** 196–199.
- Loppion G, Crespel A, Martinez A, Auvray P and Sourdain P** (2008) Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis , *Scyliorhinus canicula* L . *Cell and Tissue Research* 533–542.
- Lord JM, White SI, Bailey CJ, Atkins TW, Fletcher RF and Taylor KG** (1983) Effect of metformin on insulin receptor binding and glycaemic control in type II diabetes. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* **286** 830–831.
- Lu DY, Huang M, Xu CH, Yang WY, Hu CX, Lin LP, Tong LJ, Li MH, Lu W, Zhang XW et al.** (2005) Anti-proliferative effects , cell cycle G2 / M phase arrest and blocking of chromosome segregation by probimane and MST-16 in human tumor cell lines. *BMC Pharmacology* **11** 1–11.
- Lu C, Lee JJ, Komaki R, Herbst RS, Feng L, Evans WK, Choy H, Desjardins P, Esparaz BT, Truong MT et al.** (2010) Chemoradiotherapy with or without AE-941 in stage III non-small cell lung cancer: A randomized phase III trial. *Journal of the National Cancer Institute* **102** 859–865.

-M-

Ma C, Long H, Yang C, Cai W, Zhang T and Zhao W (2017) Anti-inflammatory Role of Pilose Antler

- Peptide in LPS-Induced Lung Injury. *Inflammation* **40** 904–912.
- Magurran AE** (2005) 4-1 Reproductive Biology and Behaviour. In *Evolutionary Ecology: The Trinidadian Guppy*. Oxford University Press, pp 71-94.
- Mascetti VL and Pedersen RA** (2016) Perspective Contributions of Mammalian Chimeras to Pluripotent Stem Cell Research. *Cell Stem Cell* **19** 163–175.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA et al.** (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3 / 4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* **9** 625–635.
- McClusky LM** (2005) Stage and season effects on cell cycle and apoptotic activities of germ cells and Sertoli cells during spermatogenesis in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Reproduction* **129** 89–102.
- Mellinger J** (1965) Stades de la spermatogenèse chez *Scyliorhinus caniculus* (L.) : description, données histochimiques, variations normales et expérimentales. *Zeitschrift Fiir Zellforschung* **67** 653–673.
- Mellinger J** (1994) L'oeuf de rousette (*Scyliorhinus canicula*) incubé au laboratoire : un matériel de recherche pour l'embryologiste, l'éthologiste, le physiologiste. *Ichthyophysiologica* **17** 9–27.
- Mellinger J** (2002) *Reproduction et Sexualité Des Poissons*. CNRS Edition, 432p.
- Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M et al.** (2000) Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF. *Science* **287** 1489–1494.
- Meng X, Rooij DG De, Westerdahl K, Saarma M and Sariola H** (2001) Promotion of Seminomatous Tumors by Targeted Overexpression of Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor in Mouse Testis 1. *Cancer Research* **61** 3267–3271.
- Metcalfe C, Kljavin NM, Ybarra R and de Sauvage FJ** (2014) Lgr5+ Stem Cells Are Indispensable for Radiation-Induced Intestinal Regeneration. *Cell Stem Cell* **14** 149–159.
- Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR and Rafieian SH** (2012) Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia* **44** 41–55.
- Mishima Y and Tomari Y** (2016) Codon Usage and 3' UTR Length Determine Maternal mRNA Stability in Zebrafish. *Molecular Cell* **61** 874–885.
- Morandi A, Martin LA, Gao Q, Pancholi S, Mackay A, Robertson D, Zvelebil M, Dowsett M, Plaza-Menacho I and Isacke CM** (2013) GDNF-RET signaling in ER-positive breast cancers is a key determinant of response and resistance to aromatase inhibitors. *Cancer Research* **73** 3783–3795.
- Morita T, Morishima K, Miwa M, Kumakura N, Kudo S, Ichida K, Mitsuboshi T, Takeuchi Y and Yoshizaki G** (2015) Functional Sperm of the Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) Were Produced in the Small-Bodied Surrogate, Jack Mackerel (*Trachurus japonicus*). *Marine Biotechnology* **17** 644–654.
- Morrison SJ and Kimble J** (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441** 1068–1074.

Müller T, Eildermann K, Dhir R, Schlatt S and Behr R (2008) Glycan stem-cell markers are specifically expressed by spermatogonia in the adult non-human primate testis. *Human Reproduction* **23** 2292–2298.

Mulley JF, Hargreaves AD, Hegarty MJ, Heller RS and Swain MT (2014) Transcriptomic analysis of the lesser spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) pancreas, liver and brain reveals molecular level conservation of vertebrate pancreas function. *BMC Genomics* **15** :1074.

Muyldermans S (2013) Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry* **82** 775–797.

Mytilineou C, Politou C, Papaconstantinou C, Kavadas S, D’Onghia G and Sion L (2005) Deep-water fish fauna in the Eastern Ionian Deep-water fish fauna in the Eastern Ionian Sea. *Belgian Journal of Zoology* **135** 229–233.

-N-

Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE and Yoshida S (2010) Functional Hierarchy and Reversibility within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. *National Institutes of Health* **328** 62–67.

Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko a R, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H and Tagami T (2007) Migration and Proliferation of Primordial Germ Cells in the Early Chicken Embryo. *Poultry Science* **86** 2182–2193.

Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Higashijima S -i. and Tanaka M (2010) Identification of Germline Stem Cells in the Ovary of the Teleost Medaka. *Science* **328** 1561–1563.

Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A and Milbrandt J (2006) Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor-Mediated RET Signaling Regulates Spermatogonial Stem Cell Fate. *Biology of Reproduction* **74** 314–321.

Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, Garber DW, Chaddha M, Hough G, Lallone R and Fogelman AM (2002) Oral Administration of an Apo A-I Mimetic Peptide Synthesized From D-Amino Acids Dramatically Reduces Atherosclerosis in Mice Independent of Plasma Cholesterol. *Circulation* **105** 290–292.

Niu Z, Goodyear SM, Avarbock MR and Brinster RL (2016) Chemokine (C-X-C) Ligand 12 Facilitates Trafficking of Donor Spermatogonial Stem Cells. *Stem Cells International* **2016** 1–8.

Nobréga RH, Greebe CD, Van De Kant H, Bogerd J, Renato de França L and Schulz RW (2010) Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. *PLoS ONE* **5**.

Nostro FL Lo, Grier H, Meijide FJ and Guerrero GA (2003) Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. *Tissue and Cell* **35** 121–132.

-O-

- O'Connor MD, Kardel MD, Iosifina I, Youssef D, Lu M, Li MM, Vercauteren S, Nagy A and Eaves CJ** (2008) Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human. *Stem Cells* **26** 1109–1116.
- O'harte FPM, Ng M., Lynch A., Colon J. and Flatt P.** (2016) Dogfish glucagon analogues counter hyperglycaemia and enhance both insulin secretion and action in diet-induced obese diabetic mice. *Wiley* **18** 1013–1024.
- Oatley JM and Brinster RL** (2008) Regulation of Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in Mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24** 263–286.
- Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW and Brinster RL** (2009) Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development* **136** 1191–1199.
- Oatley MJ, Kaucher A V, Racicot KE and Oatley JM** (2011) Inhibitor of DNA Binding 4 Is Expressed Selectively by Single Spermatogonia in the Male Germline and Regulates the Self-Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Mice 1. *Biology of Reproduction* **85** 347–356.
- Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Takeuchi T and Yoshizaki G** (2006) Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103** 2725–2729.
- Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y and Yoshizaki G** (2007) Production of Trout Offspring from Triploid Salmon Parents. *Science* **317** 1517.
- Olivera BM** (2006) Conus Peptides: Biodiversity-based Discovery and Exogenomics. *Journal of Biological Chemistry* **281** 31173–31177.
- Onohara Y and Yokot S** (2012) Nuage Components and Their Contents in Mammalian Spermatogenic Cells, as Revealed by Immunoelectron Microscopy. In *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*. InTech. p217-240
- Osawa M, Hanada K, Hamada H and Nakauchi H** (1996) Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science* **273** 242–245.
- Ozaki Y, Saito K, Shinya M, Kawasaki T and Sakai N** (2011) Evaluation of Sycp3, Plzf and Cyclin B3 expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expression Patterns* **11** 309–315.

-P-

- Palis J** (2014) Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Frontiers in Physiology* **5** 1–9.
- Panda RP, Barman HK and Mohapatra C** (2011) Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for in vitro propagation. *Theriogenology* **76** 241–251.
- Papo N and Shai Y** (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* **62** 784–790.

- Park I, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K and Daley GQ** (2008) Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* **134** 877–886.
- Parsa N** (2012) Environmental Factors Inducing Human Cancers. *Iranian Journal of Public Health* **41** 1–9.
- Parvinen M and Jokelainen PT** (1974) Rapid movements of the chromatoid body in living early spermatids of the rat. *Biology of Reproduction* **11** 85–92.
- Philis-Tsimikas A** (2009) Type 2 Diabetes : Limitations of Current Therapies. *Consultant* 5–11.
- Phillips BT, Gassei K and Orwig KE** (2010) Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **365** 1663–1678.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR** (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **284** 143–147.
- Poh Y, Chen J, Hong Y, Yi H, Zhang S, Chen J, Wu DC, Wang L, Jia Q, Singh R et al.** (2014) Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell. *Nature Communications* **5** 1–12.
- Potter SJ and DeFalco T** (2017) Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction* **153** R151–R162.
- Powell RH, Biancardi MN, Pope CE, Leibo SP, Wang G and Gómez MC** (2012) Isolation and Characterization of Domestic Cat Spermatogonial Cells. *Reproduction, Fertility and Development* **24** 221.
- Pradel A and Janvier P** (2016) Elasmobranchs and Their Extinct Relatives: Diversity, Relationships, and Adaptations Through Time. In *physiology of elasmobranch fishes: structure and interaction with environment*. p 1-17
- Pramod RK and Mitra A** (2014) In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (*Capra hircus*). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **31** 993–1001.
- Pratt HL** (1988) Elasmobranch Gonad Structure : A Description and Survey. *Copeia* **3** 719–729.
- Pšenička M, Saito T, Linhartová Z and Gazo I** (2015) Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology* **83** 1085–1092.

-Q-

- Quan FB, Kenigfest NB, Mazan S and Tostivint H** (2013) General and Comparative Endocrinology Molecular cloning of the cDNAs encoding three somatostatin variants in the dogfish (*Scylorhinus canicula*). *General and Comparative Endocrinology* **180** 1–6.

-R-

- Reding SC, Stepnoski AL, Cloninger EW and Oatley JM** (2010) THY1 is a conserved marker of

undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction* **139** 893–903.

Redon E, Bosseboeuf A, Rocancourt C, Da Silva C, Wincker P, Mazan S and Sourdain P (2010) Stage-specific gene expression during spermatogenesis in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Reproduction* **140** 57–71.

Reginster J-Y (1993) Calcitonin for prevention and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine* **95** S44–S47.

Rêgo MG, Hazin FH V, Neto JE, Oliveira PG V, Soares G, Torres KRLS, Lana FO, Roque PCG, Santos NL and Coelho R (2013) Morphological analysis and description of the ovaries of female silky sharks, *Carcharhinus falciformis* (Müller & Henle, 1839). *Neotropical Ichthyology* **11** 815–819.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414** 105–111.

Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R and Weissman IL (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423** 409–414.

Richardson BE and Lehmann R (2015) Mechanisms guiding primordial germ cell migration : strategies from different organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11** 37–49.

De Rooij DG (2001) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction (Cambridge, England)* **121** 347–354.

De Rooij DG and Russell LD (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology* **21** 776–798.

Rowley MJ, Berlin JD and Heller CG (1971) The Ultrastructure of Four Types of Human Spermatogonia *. *Z. Zellforsch* **112** 139–157.

-S-

Sada A, Suzuki A, Suzuki H and Saga Y (2009) The RNA-Binding Protein NANOS2 Is Required to Maintain Murine Spermatogonial Stem Cells. *Science* **325** 1394–1399.

Safarzadeh E, Shotorbani SS and Baradaran B (2014) Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **4** 421–427.

Santos Nassif Lacerda SM, Costa GMJ, da Silva M de A, Almeida Campos-Junior PH, Segatelli TM, Peixoto MTD, Resende RR and de França LR (2013) Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *General and Comparative Endocrinology* **192** 95–106.

Sarmento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R and Ferreira D (2007) Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharmaceutical Research* **24** 2198–2206.

Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4** 7–25.

Schrans-Stassen BHG., Van de Kant HJ., De Rooij DG and Van Pelt AMM (1999) Differential Expression of c-kit in Mouse Undifferentiated and Differentiating Type A Spermatogonia.

Endocrinology **140** 5894–5900.

- Schulz RW, van Dijk W, Chaves-Pozo E, García-López Á, de França LR and Bogerd J** (2005a) Sertoli cell proliferation in the adult testis is induced by unilateral gonadectomy in African catfish. *General and Comparative Endocrinology* **177** 160–167.
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR and Godinho HP** (2005b) Sertoli cell proliferation in the adult testis--evidence from two fish species belonging to different orders. *Biology of Reproduction* **73** 891–898.
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DAR and Godinho HP** (2005c) Sertoli cell proliferation in the adult testis--evidence from two fish species belonging to different orders. *Biology of Reproduction* **73** 891–898.
- Schulz RW, Renato de França L, Lareyre J, Legac F, Chiarini-garcia H, Nobrega HR and Miura T** (2010a) Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* **165** 390–411.
- Schulz RW, Renato de França L, Lareyre J, Legac F, Chiarini-garcia H, Nobrega HR and Miura T** (2010b) Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* **165** 390–411.
- Sell S** (1993) Cellular Origin of Cancer : Dedifferentiation or Stem Cell Maturation by Stewart Sell. *Environmental Health Perspectives* **101** 15–26.
- Sell S** (2004) Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **51** 1–28.
- Senter PD and Sievers EL** (2012) The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nature Biotechnology* **30** 631–637.
- Séret B** (2010) *Guide Des Requins, Des Raies et Des Chimères Des Pêches Françaises*. p 1-153
- Servili A, Rose M, Nishikawa R, Sanchez I, Melo D, Muñoz-cueto JA and Lee LEJ** (2009) Establishment of long term cultures of neural stem cells from adult sea bass , *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **152** 245–254.
- Shai Y and Oren Z** (2001) From ‘carpet’ mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* **22** 1629–1641.
- Sharma M, Afrin F, Satija N, Tripathi RP and Gangenahalli GU** (2011) Stromal-Derived Factor-1/ CXCR4 Signaling: Indispensable Role in Homing and Engraftment of Hematopoietic Stem Cells in Bone Marrow. *Stem Cells and Development* **20** 933–946.
- Sharov AA, Masui S, Sharova L V, Piao Y, Aiba K, Matoba R, Xin L, Niwa H and Ko MSH** (2008) Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics* **9** :269.
- Sheng XR and Matunis E** (2011) Live imaging of the Drosophila spermatogonial stem cell niche reveals novel mechanisms regulating germline stem cell output. *Development* **138** 3367–3376.
- Shi G and Jin Y** (2010) Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy* **1** :39.
- Shikina S, Nagasawa K, Hayashi M, Furuya M, Iwasaki Y and Yoshizaki G** (2013) Short-term in vitro culturing improves transplantability of type A spermatogonia in rainbow trout (*Oncorhynchus*

- mykiss). *Molecular Reproduction and Development* **80** 763–773.
- Shinohara T, Avarbock MR and Brinster RL** (1999) b1 - and a6 -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. **96** 5504–5509.
- Shukla KK, Mahdi AA and Rajender S** (2012) Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in Bioscience* **E4** 746.
- Sills AK, Williams JI, Tyler BM, Epstein DS, Sipos EP, Davis JD, Mclane MP, Pitchford S, Cheshire K, Gannon FH et al.** (1998) Squalamine Inhibits Angiogenesis and Solid Tumor Growth in Vivo and Perturbs Embryonic Vasculature1. *Cancer Research* **58** 2784–2792.
- Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, Oosten AL Van, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I and Smith A** (2009) Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell* **138** 722–737.
- Silva RC, Costa GMJ, Lacerda MMSN, Batlouni SR, Soares JM, Avelar GF, Böttger KB, Silva JR SF, Nogueira MS, Andrade LM et al.** (2012) Germ Cell Transplantation in Felids : A Potential Approach to Preserving Endangered Species. *Journal of Andrology* **33** 264–276.
- Silva MA, Costa GMJ, Lacerda SMSN, Brandão-Dias PFP, Kalapothakis E, Silva Júnior AF, Alvarenga ER and França LR** (2016) Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. *General and Comparative Endocrinology* **230-231** 48–56.
- Simon L, Ekman GC, Garcia T, Carnes K, Zhang Z, Murphy T, Murphy KM, Hess RA, Cooke PS and Hofmann M-C** (2010) ETV5 Regulates Sertoli Cell Chemokines Involved in Mouse Stem/Progenitor Spermatogonia Maintenance. *STEM CELLS* **28** 1882–1892.
- Singh SR, Burnicka-turek O, Chauhan C and Hou SX** (2011) Spermatogonial stem cells , infertility and testicular cancer. *J. Cell. Mol. Med* **15** 468–483.
- Singh S, Chang H-Y, Richards TM, Weiner JP, Clark JM and Segal JB** (2013) Glucagonlike Peptide 1–Based Therapies and Risk of Hospitalization for Acute Pancreatitis in Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA Internal Medicine* **173** 534.
- Siqueira-Silva DH de, Vicentini CA, Ninhaus-Silveira A and Veríssimo-Silveira R** (2013) Reproductive cycle of the Neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: A novel pattern of testicular development. *Neotropical Ichthyology* **11** 587–596.
- Sola D, Rossi L, Schianca GPC, Maffioli P, Bigliocca M, Mella R, Corliano F, Paolo Fra G, Bartoli E and Derosa G** (2015) Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science* **11** 840–848.
- Song X, Call GB, Kirilly D and Xie T** (2007) Notch signaling controls germline stem cell niche formation in the *Drosophila* ovary. *Development* **134** 1071–1080.
- Sourdaine P and Jégou B** (1989) Dissociation and identification of intact seminiferous lobules from the testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Cell And Tissue Research* **255** 199–207.
- Srihawong T, Kuwana T, Siripattarapratvat K and Tirawattanawanich C** (2015) Chicken primordial germ cell motility in response to stem cell factor sensing. *The International Journal of Developmental Biology* **59** 453–460.
- Stanfield RL, Dooley H, Flajnik MF and Wilson IA** (2004) Crystal Structure of a Shark Single-Domain

Antibody V Region in Complex with Lysozyme. *Science* **305** 1770–1773.

Stanley HP (1966a) The Structure And Development of The Seminiferous Follicle in Scyliorhinus Caniculus And Torpedo Marmorata (Elasmobranchii). *Zeitschrift Fiir Zellforschung* **75** 453–468.

Starz-gaiano M and Lehmann R (2001) Moving towards the next generation. *Mechanisms of Development* **105** 5–18.

Stefkova K, Prochazkova J and Pachernik J (2015) Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Hindawi*. **2015** p 1-11

Stiles J and Jernigan TL (2010) The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review* **20** 327–348.

Sun F, Xu Q, Zhao D and Chen CD (2015) Id4 Marks Spermatogonial Stem Cells in the Mouse Testis. *Scientific Reports* 2–13.

Sun Z, Wang Y, Lu W, Li Z, Liu X, Li S, Zhou L and Gui J (2017) Divergent Expression Patterns and Function Implications of Four nanos Genes in a Hermaphroditic Fish , Epinephelus coioides. *International Journal of Molecular Sciences*. **18** 685

Suzuki H, Sada A, Yoshida S and Saga Y (2009) The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. *Developmental Biology* **336** 222–231.

-T-

Tajima A, Naito M, Yasuda Y and Kuwana T (1993) Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* **40** 509–519.

Tajima Y, Sawada K, Morimoto T and Nishimune Y (1994) Switching of mouse spermatogonial proliferation from the c-kit receptor-independent type to the receptor-dependent type during differentiation. *Journal of Reproduction and Fertility* **102** 117–122.

Takada Y, Ye X and Simon S (2007) The integrins. *Genome Biology* **8** 215.1–215.9.

Takahashi M (2001) The GDNF / RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **12** 361–373.

Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126** 663–676.

Takeuchi Y, Yoshizaki G and Takeuchi T (2003a) Generation of Live Fry from Intraperitoneally Transplanted Primordial Germ Cells in Rainbow Trout. *Biology of Reproduction* **69** 1142–1149.

Takeuchi T, Tanigawa Y, Minamide R, Ikenishi K and Komiya T (2010) Analysis of SDF-1/CXCR4 signaling in primordial germ cell migration and survival or differentiation in *Xenopus laevis*. *Mechanisms of Development* **127** 146–158.

Tam PPL and Zhou SX (1996) The Allocation of Epiblast Cells to Ectodermal and Germ-Line Lineages Is Influenced by the Position of the Cells in the Gastrulating Mouse Embryo. *Developmental Biology* **178** 124–132.

- Taranger GL, Haux C, Hansen T, Stefansson SO, Björnsson BT, Walther BT and Kryvi H** (1999) Mechanisms underlying photoperiodic effects on age at sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* **177** 47–60.
- Tegelenbosch RAJ and De Rooij DG** (1993) A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H / 101 F 1 hybrid mouse. *Mutation Research* **290** 193–200.
- Thiebold J** (1963) Contribution à l'étude de l'organogenèse urogénitale et de son déterminisme chez un poisson élasmobranche : la petite roussette 'Scyliorhinus canicula'. *Bull.biol.Fr. Belg* **98** 253-347
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA and Hearn JP** (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **92** 7844–7848.
- Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM** (1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282** 1145–1147.
- Till JE and McCulloch EA** (1961) A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* **14** 213–222.
- Tixier A and Gaillard J.** (1957) *Anatomie Animale et Dissection*. Vigot Paris, 375p.
- Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H and Marunouchi T** (2007) CDH1 Is a Specific Marker for Undifferentiated Spermatogonia in Mouse Testes 1. *Biology of Reproduction* **76** 130–141.
- Tomasetti C, Vogelstein B, Cancer SK, Hopkins J and Cancer K** (2016) Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **347** 78–81.
- Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S and Kobayashi S** (2003) Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science* **301** 1239–1241.
- Tu J, Fan L, Tao K, Zhu W, Li J and Lu G** (2007) Stem cell factor affects fate determination of human gonocytes in vitro. *Reproduction* **134** 757–765.
- Tweedell KS** (2017) The Adaptability of Somatic Stem Cells: A Review. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine* **13** 3–13.

-U-

- Umar S** (2010) Intestinal Stem Cells. *Current Gastroenterology Reports* **12** 340–348.
- Uribe MC, Grier HJ and Mejía-Roa V** (2014) Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis* **4** e983400–e983401 – e983400–e983413.

-V-

- Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS and Bernstein I** (2000) Pluripotent , cytokine-dependent , hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature Medecin* **6** 1278–1281.

Vindelov L, Hansen H. and Spang-Thomsen M (1985) Growth Characteristics and Heterogeneity of Small Cells Carcinoma of the Lung. In *Small Cell Cancer Lung*, pp 47–54.

-W-

Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR and Wang SL (2011) Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine* **6** 765.

Wang L, Cao J, Ji P, Zhang D, Ma L, Dym M, Yu Z and Feng L (2012) Oocyte-like cells induced from mouse spermatogonial stem cells. *Cell & Bioscience* **2** 27.

Ward EJ, Shcherbata HR, Reynolds SH, Fischer KA, Hatfield SD and Ruohola-Baker H (2006) Stem Cells Signal to the Niche through the Notch Pathway in the Drosophila Ovary. *Current Biology* **16** 2352–2358.

Whetton AD and Graham GJ (1999) Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends in Cell Biology* **9** 233–238.

White BD, Chien AJ and Dawson DW (2013) Dysregulation of Wnt/B-catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers. *National Institutes of Health* **142** 219–232.

Wijnhoven BPL, Dinjens WNM and Pignatelli M (2000) E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *British Journal of Surgery* **87** 992–1005.

Wisneski LA, Croom WP, Silva OL and Becker KL (1978) Salmon calcitonin in hypercalcemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **24** 219–222.

Wong T-T, Saito T, Crodian J and Collodi P (2011) Zebrafish Germline Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae1. *Biology of Reproduction* **84** 1190–1197.

Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A and Nagy A (1993) Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature* **365** 87–89.

Wu X, Goodyear SM, Tobias JW, Avarbock MR and Brinster RL (2011) Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires ETV5-Mediated Downstream Activation of Brachyury in Mice 1. *Biology of Reproduction* **85** 1114–1123.

Wu X, Goodyear SM, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Tobias JW, Avarbock MR and Brinster RL (2012) Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Human Molecular Genetics* **27** 1249–1259.

-X-

Xiang R, Liao D, Cheng T, Zhou H, Shi Q, Chuang T, Markowitz D, Reisfeld R and Luo Y (2011) Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. *British Journal of Cancer* **104** 1410–1417.

Xiao Y, Jie M, Li B, Hu C, Xie R, Tang B and Yang S (2015) Peptide-Based Treatment : A Promising Cancer Therapy. **2015** 1-13

Xiong Q, Yu C, Zhang Y, Ling L, Wang L and Gao J (2017) Key proteins involved in insulin vesicle exocytosis and secretion. *Biomedical Reports* **6** 134–139.

Xu R, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP and Thomson JA (2002) BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nature Biotechnology* **20** 1261–1264.

-Y-

Yamada T, Mehta RR, Lekmine F, Christov K, King ML, Majumdar D, Shilkaitis A, Green A, Bratescu L, Beattie CW et al. (2009) A peptide fragment of azurin induces a p53-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **8** 2947–2958.

Yamaha E, Kazama-Wakabayashi M, Otani S, Fujimoto T and Arai K (2001) Germ-line chimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. *Genetica* **111** 227–236.

Yamashita YM, Jones DL and Fuller MT (2003) Orientation of Asymmetric Stem Cell Division by the APC Tumor Suppressor and Centrosome. *Science* **301** 1547–1551.

Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Mansson R, Sigvardsson M and Jacobsen SEW (2005) Identification of Lin-Sca1+kit+CD34+Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* **105** 2717–2723.

Yang H, Savage MG, Hazlewood L, Walter RB and Tiersch TR (2012) Offspring production with cryopreserved sperm from a live-bearing fish *Xiphophorus maculatus* and implications for female fecundity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **155** 55–63.

Yang Q, Kim D, Kaucher A, Oatley MJ and Oatley JM (2013) CXCL12 – CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells. *Journal of Cell Science* **126** 1009–1020.

Yazawa R, Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Kabeya N and Yoshizaki G (2010) Chub Mackerel Gonads Support Colonization, Survival, and Proliferation of Intraperitoneally Transplanted Xenogenic Germ Cells 1. *Biology of Reproduction* **82** 896–904.

Yeaman MR and Yount NY (2003) Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* **55** 27–55.

Yoshida S, Sukeno M and Nabeshima Y (2007) A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. *Science* **317** 1722–1727.

Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T and Nishikawa S (1991) Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* **113** 689–699.

Yoshizaki G, Fujinuma K, Iwasaki Y, Okutsu T, Shikina S, Yazawa R and Takeuchi Y (2011) Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources ☆. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* **6** 55–61.

Yoshizaki G, Okutsu T, Morita T, Terasawa M, Yazawa R and Takeuchi Y (2012) Biological Characteristics of Fish Germ Cells and their Application to Developmental Biotechnology. *Reproduction in Domestic Animals* **47** 187–192.

Youson JH and Al-Mahrouki AA (1999) REVIEW Ontogenetic and Phylogenetic Development of the Endocrine Pancreas (Islet Organ) in Fishes. *General and Comparative Endocrinology* **116**, 303–335.

Yun K, Mantani A, Garel S, Rubenstein J and Israel MA (2004) Id4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation in vivo. *Development* **131** 5441–5448.

-Z-

Zasloff M, Adams P, Beckerman B, Campbell A, Han Z, Luijten E, Meza I, Julander J, Mishra A, Taylor JM et al. (2011) Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** 18186–18186.

Zhang T, Rawson DM, Pekarsky I, Blais I and Lubzens E (2007) Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In *The fish oocyte From Basic Studies to Biotechnological Applications*, p 411.

Zhang J, Woodhead GJ, Swaminathan SK, Noles SR, Erin R, Pisarek AJ, Stocker AM, Mutch CA, Funatsu N and Chenn A (2011a) Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. *National Institutes of Health* **18** 472–479.

Zhang J, Branch DW, Ramirez MM, Laughon SK, Reddy U, Hoffman M, Bailit J, Kominiarek M, Chen Z and Hibbard JU (2011b) Oxytocin Regimen for Labor Augmentation, Labor Progression, and Perinatal Outcomes. *Obstetrics & Gynecology* **118** 249–256.

Zhang WY, Almeida PE De and Wu JC (2012a) Teratoma formation : A tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Stemcellbook* 1–14.

Zhang Y, Wang S, Wang X, Liao S, Wu Y and Han C (2012b) Endogenously produced FGF2 is essential for the survival and proliferation of cultured mouse spermatogonial stem cells. *Cell Research* **22** 773–776.

Zhang Y, Wu S, Luo F, Liu L, Hu T, Yu B, Li G and Wu Y (2014) CDH1 , a Novel Surface Marker of Spermatogonial Stem Cells in Sheep Testis. *Journal of Integrative Agriculture* **13** 1759–1765.

Zheng K, Wu X, Kaestner KH and Wang PJ (2009) The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Developmental Biology* **9** 1–11.

Zhu CF, Peng HB, Liu GQ, Zhang F and Li Y (2010) Beneficial effects of oligopeptides from marine salmon skin in a rat model of type 2 diabetes. *Nutrition* **26** 1014–1020.

Zielonka S, Empting M, Grzeschik J, Könning D, Barelle CJ and Kolmar H (2015) Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *mAbs* **7** 15–25.

Annexe

CHAPITRE D'OUVRAGE

Spermatogenesis and Spermiogenesis in Elasmobranchs, a short overview.

Pascal SOURDAINE; Aude GAUTIER ; Laura GRIBOUVAL

Encyclopedia of Reproduction, Second Edition.

M. Skinner

Title:

Spermatogenesis and Spermiogenesis in Elasmobranchs, a short overview.

Authors:

Pascal Sourdain, Aude Gautier, Laura Gribouval

Affiliation :

Normandie Univ, UNICAEN, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS, IRD, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), CS14032, 14032 CAEN, Cedex 5, France

Email address :

pascal.sourdain@unicaen.fr

aude.gautier@unicaen.fr

laura.gribouval@unicaen.fr

Key words:

Elasmobranchs, Leydig cells, Rays, Reproduction, Sertoli cells, Sharks, Skates, Spermatids, Spermatogenesis, Spermatogonia,

Abstract

A descriptive presentation of spermatogenesis in elasmobranchs (skates, rays and sharks) is presented. The spermatocystic type and zonal organization of testis can be a useful model to allow an easy access to the main stages of spermatogenesis, facilitating their characterization. Specific features of elasmobranchs are also underlined.

Introduction

Elasmobranchs, comprising skates, rays and sharks, belong to chondrichthyans which include also the chimaeras (Holocephalans). Chondrichthyans are the sister group of bony vertebrates with a time of divergence estimated between 462 and 421 million years ago (MYA) but recent knowledge on fossilized chondrichthyans suggest that the last common ancestor of elasmobranchs and holocephalans lived about 370-380 MYA. Despite the phylogenetic interest of Chondrichthyans and their high number of species (around 1200), they have been the subject of too few publications, notably concerning their reproduction. However, spermatogenesis in elasmobranchs is at the origin of old observations, particularly at the middle of the 19th century with the advent of microscopy, because of the advantages associated to the anatomical organization of their testis. In 1841, Lallemand observed that spermatozoa formation occurs into “spherical ampullae”, what we name presently spermatocysts, in rays and, in 1875, Semper gave a first description of the different stages of spermatogenesis in dogfish. La Valette St George (1878) was the first to describe the close association between germ cells and Sertoli cells to give, what he called “spermatogennum”, currently called “spermatoblast”. A century later, the stages of spermatogenesis were more precisely classified and quantified by works of Mellinger (1965), Stanley (1966) or Holstein (1969) in the lesser spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* (Carcharhiniformes) and the spiny dogfish *Squalus acanthias* (Squaliformes). For all elasmobranchs, the unit structure of the testis is the spheroidal spermatocysts (cyst) (terms used by previous authors were ampulla of follicle), defining the testicular structure in elasmobranchs as polyspermatocystic type. Each cyst is made up of spermatoblast in which one Sertoli cell is associated to a clone of synchronous developing germ cell, from 1 spermatogonium initially to 64 mature spermatids. Cysts originate from germinative zone located at fixed sites on the dorsal or dorsal-lateral margins of the testis according to species. Because new cysts are being formed and added continually, older cysts are moved in sequential order leading to a zonate arrangement according to the spermatogenetic wave. Therefore, a cross section of the testis displays a dorsoventrally oriented succession of zones corresponding to spermatogonial, spermatocytes, early spermatids, late spermatids and degeneration zones.

The male genital tract.

Anatomically, the male genital tract of elasmobranchs is elaborated (Figure 1). Two elongated testes have the particularity to be closely associated to the epigonal tissue, a lymphomyeloid tissue producing leukocytes, granulocytes and lymphocytes. Spermatozoa are collected through a paired duct system associated to each testis and made of intra-testicular tubules (branched and stem tubules), collecting

tubules and from two to six efferent ducts (*rete testis* homolog) in sharks or one efferent duct in rays and skates. Efferent duct is followed by one epididymis composed of a proximal and distal segment, one deferent duct enlarged at its end into seminal vesicle. Seminal vesicle often expanded to form an ampulla used for sperm storage and the two seminal vesicles converge in their posterior region. In skate and rays, Marshall's alkaline glands (incorrectly named sperm sacs since they are devoid of sperm) arise as diverticula from this posterior region. Sperm passes from the urogenital sinus to the urogenital papilla which consists of the groove of pelvic clasper, the copulatory organs of chondrichthyans used for internal fertilization. Male elasmobranchs possess unique reproductive associated glands: the Leydig's gland and siphons sacs in sharks or clasper glands in skates and rays. Leydig's gland is closely associated and connected to the deferent duct and secretes part of the seminal fluid. Since their functions remain to be clarified, siphon sacs could either facilitate the transfer of sperm to the female (Gilbert and Heath, 1972) by inducing uterine contractions or assist sperm competition by washing female genital tract before copulation with a water flux. Most skates and rays have a clasper gland that may facilitate copulation by providing a lubricant and a fluid coagulating with sea water that could seal the groove of the clasper to form a tube (Wourms, 1977). A diversity of functions could be respectively attributed to siphon sacs and clasper glands but both, in terms, facilitate fertilization.

Anatomy of testis

According to species and testicular type, germinative area is unique or multiple. In Squalomorph, Galeomorph and Charcharhinidae shark species, the germinative area consist of one band located between albuginea and the main testicular blood vessel which runs the dorsal length of the testis. This testicular structure has been classified as diametric-type testis (Pratt, 1988b) by Pratt in 1988 (Figure 2). Squaliformes as *Centroscymines coelolepes* and *Centrophorus squamosus* may present lobate testis and each lobe has a diametric structure (Girard *et al.*, 2000). In Lamniformes, testis comprises seminiferous lobules (Radial-type testis). The germinative area is in the center of each seminiferous lobule and cyst development proceeds radially from the germinal area. In skates and rays, testis combines radial and diametric structure and was termed "compound" by Pratt. Their testis may comprise lobate divisions as observed for the Cownose Ray, *Rhinoptera bonasus* (Poulakis and Grier, 2014). Germinative areas originate from the germinal papilla that appears as a small projection at the dorsal surface of the testis and cyst development proceeds diametrically from each germinative area.

The mitotic proliferative phase of spermatogenesis.

To describe precisely the different stages of spermatogenesis, the example of *Scyliorhinus canicula* will be detailed below (Loir *et al.*, 1995) (Figure 3). Stage I corresponds to large spermatogonia (10 µm in nuclear diameter) of the germinative zone, surrounded by elongated somatic cells which corresponds to Sertoli cell precursors. In the different subparts of the germinative zone, from the area just behind the fibrous albuginea toward the blood vessel, spermatogonia are isolated, paired or in clusters of 4 and they can be qualified of A single (As), A paired (Apr) and A4und undifferentiated spermatogonia, respectively. Their ultrastructure observed by transmission electron microscopy reveals a nucleus with chromatin of a mottled appearance, a nucleolus and a cytoplasm containing

numerous mitochondria and a dense material, the germinative nuage. After the first mitotic division, all spermatogonia still with intercellular bridges to form a germ cell syncytium (Figure 4). While leaving the germinative area, both Sertoli cell precursors and spermatogonia proliferate and both types of cells regroup progressively to form spherical cysts with a lumen that progressively appears (stage II). Stage III corresponds to the end of the cysts formation with a single layer of Sertoli cell nuclei around the central lumen and a single layer (stage IIIa) or two layers (stage IIIb) of spermatogonia toward the basal lamina. Here, it is important to notice that the cyst formation (stage IIIa) coinciding with the end of Sertoli cell divisions and to the further four mitoses of differentiated spermatogonia (stages IIIb to VI). Stage IV has four layers of spermatogonia and Sertoli cell nuclei remaining at the adluminal position. Stage V presents five layers of spermatogonia and Sertoli cell nuclei, which are at an adluminal (majority) or at an intermediate position. Stage VI exhibits about six layers of spermatogonia (corresponding to pre-leptotene spermatocytes) and Sertoli cell nuclei are in an intermediate (majority) or basal position. The number of germ cell per spermatoblast is 4, 8 and 16 for stages IV, V and VI, respectively.

Considering the ratio number of 1 Sertoli for 1 spermatogonium at stage IIIa, and the number of Sertoli cell nuclei per cyst (reflecting also the number of spermatoblasts per cyst), it is possible to evaluate the number of cell mitotic division for undifferentiated spermatogonia. Holstein (1969) has determined 469 spermatoblasts per cysts in *Squalus acanthias* and this number is about 500 in *Scyliorhinus canicula* cysts (Stanley, 1966a) and about 250 in *Torpedo marmorata* cysts (Wourms, 1977). In *S. canicula* and *S. acanthias*, this will correspond to 9 cell cycle division for undifferentiated spermatogonia (from As to Aund 512) and to 4 more divisions for differentiated spermatogonia (from Ad1 to PL spermatocytes), considering that no division occurs between the last stage of undifferentiated spermatogonia and the first stage of differentiated ones. Concerning *T. marmorata*, the total number of spermatogonial mitotic divisions is 12 instead of 13. This high proliferative phase allows to produce a large number of spermatozoa from a small number of germinal stem cell. Otherwise, the difference between the theoretical (512) and observed (469) number of spermatoblasts suggest an apoptosis control of testicular homeostasis as observed for all vertebrates and studied in *S. acanthias* (McClusky, 2012) or in the ray *T. Marmorata*.

This ability to observe these different generations of spermatogonia, is also of interest for studying spermatogonial stem cells and their progeny by establishing a molecular signature for each of them using in situ hybridization and by immunocytochemistry approaches. Such studies have shown, for example, that one of the most universal spermatogonial stem cell regulator, the GDNF receptor GFRa1, is expressed in undifferentiated spermatogonia (Bosseboeuf *et al.*, 2014b; Gautier *et al.*, 2014).

Meiosis

In the dogfish *S. canicula*, meiosis proceeds from stages VII to XI (Figure 3). Stage VII corresponds to cysts containing the primary spermatocytes at the meiotic prophase and all the Sertoli cell nuclei are observed against the basal lamina. Stage VIII corresponds to the first meiotic division (metaphase, anaphase, telophase) which gives secondary spermatocytes (stages IX and X). At the end of meiosis, the number of early spermatids (or round spermatids) is of 64 per spermatoblast.

Spermiogenesis

Spermiogenesis is the development of spermatids into the mature spermatozoa. During this process, the main cell transformations are the acrosome formation, the compaction of chromatin with the replacement of histones by transition proteins and then protamines, the flagella assembly and the cytoplasm reorganization with elimination of its major part and of its organelles to keep a cytoplasm mainly restricted to the midpiece containing mitochondria. In *S. canicula*, stage XI corresponds to cysts with young round spermatids arranged as “a festoon figure” with nuclei showing patches of dense chromatin and flagella which are noticeable (Figure 3). In stage XII, condensation of the chromatin is well advanced and elongation of the spermatid head and the flagellum are observable on histological sections. During the following stages, the development of the helical head, a characteristic feature of chondrichthyan spermatozoa, occurs and is completed at stage XIV. At this stage spermatids are arranged in parallel bundles which are perpendicular to the basal lamina of the cyst. The helical twisting of the spermatid which includes the head, the midpiece and flagellar elements (the axoneme and/or microtubules according to species) has a function to motility of spermatozoa achieved by revolving around their long axis. During stages XV to XVII, the nuclei of Sertoli cell migration towards the intermediate cytoplasm of the cell and spermatid bundles become more compact and close to the basal lamina. The midpiece of spermatid is also well noticeable at the back of the head. At the ultrastructure level, for the spiny dogfish, glycogen granules are present and dispersed between mitochondria, the acrosome forms an elongated cap over the nucleus of the spermatid and a short perforatorium develops between the nucleus and the acrosome (in the subacrosomal space) (Pudney, 1995). Classically, the function of the perforatorium is the penetration of the sperm through the egg chorion during fertilization. The flagellar apparatus of spermatozoa is also characterized by the presence of flagellar roots which form the axis of the midpiece and the existence of two longitudinal columns associated with the axoneme. The function of this longitudinal columns is unknown and could be associated to the revolving motility of spermatozoa by restringing lateral beating of the flagella.

Another characteristic feature during the stages of spermiogenesis in elasmobranchs, is the apparition of a large protein body in the intermediate cytoplasm of Sertoli cell (stage XVI), the Semper's body. Its function is unclear and it will be released with bundles of spermatozoa during spermiation. A similar body have been found in the semen of the spiny dogfish and named “Sertoli cell cytoplasm”. As it contains organelles (mitochondria, ribosomes, endoplasmic reticulum and lipid droplets), some of them associated to steroid synthesis, Pudney and Callard hypothesized that it could contribute to the steroids found in the semen and necessary for maturation and maintenance of spermatozoa in the reproductive ducts (Pudney and Callard, 1986). Another hypothesis may be that the Semper's body is equivalent to the residual body observed for mammalian spermatids. Its function remains to be studied. Stage XVIII corresponds to the spermiation which takes place by the detachment of the spermatid bundle which carries with him the adluminal part of the sertolien cytoplasm. Bundles of spermatozoa are then evacuated through the cystic collecting ductule (branched tubules), previously closed by a cellular plug. By taking into account the number of 500 spermatoblasts in *S. canicula* and of 250 in *T. marmorata*, it could be calculated that 32,000 and 16,000 spermatozoa will be produced per cyst, respectively for these species.

The post-spermiation cyst contains the remaining basal cytoplasm and nuclei of Sertoli cells and will be resorbed in the epigonal organ, underlying the characteristic feature of the close association between this lymphomyeloid tissue and the testis in elasmobranchs. Another interesting feature about

this association was the inhibitory effect on DNA synthesis of premeiotic cysts by epigonal cytosolic extracts, suggesting a crosstalk between the two organs to regulate the spermatogenic cycle. Involvement of growth factors (GDNF, IGF1, FGF2...) and cytokins (IL1, G-CSF...) in the regulation of spermatogonial proliferation is now well documented in several species.

Blood-testis barrier

In amniotes, the blood-testis barrier (BTB) is essential for spermatogenesis and takes place during puberty when Sertoli cells stop mitosis. Classically, blood–tissue barriers restrict or control the entry of molecules present in circulation from entering a tissue or compartment. This barrier partially made of specialized junctions between Sertoli cells “protects” haploid cells in a specific microenvironment and allows also the production of the testicular fluid useful, in particular, for transporting spermatozoa. This blood-testis barrier can be visualized by exclusion of a high molecular weight (10 kDa) fluorescent dye. Using this approach, McClusky has shown that living post-meiotic cysts are impermeant, suggesting a functional blood-testis barrier in cysts containing spermatids in the spiny dogfish (McClusky, 2006). Furthermore, in spermatid cysts, tight junctions have been observed between Sertoli cells, reinforcing the presence of a BTB but the precise description of its ultrastructural components remains to be done.

Sperm transport, maturation and storage

Structure of a branching intratesticular network of ducts has been well described in the starspotted smooth-hound *Mustelus manazo* (Park *et al.*, 2013). This system is composed of branched tubules, linked to cysts, which are connected via a secondary network of stem tubules to the collecting tubules. Branched and stem ducts can be observed early in the cyst-forming area (stage II) and during the spermatogenetic wave, cysts are still attached to branch tubules. This implies that both cyst and tubules will move together from the germinal to the mature zone of the testis, undoubtedly involving regulatory mechanisms not yet known. During spermiation, branched tubules open at their junction with the cyst allowing the flow of bundles of spermatozoa into the stem tubules. Transport of spermatozoa will be achieved thanks the presence of ciliated epithelial cells lining the lumen of branched, stem and collecting ducts. Contraction of myoid cells surrounding the intratesticular ducts probably also contributes to the transport of spermatozoa towards the epididymis where maturation occurs. In Mammals, spermatozoa acquire their motility and fertilizing properties during their epididymal transit. Epididymis has been poorly studied in elasmobranchs, which is surprising considering its size and its apparent similarity to that of mammals. Its study in the Port Jackson Shark, *Heterodontus portusjacksoni* and in the Clearnose Skate *Raja eglanteria* have shown that epididymis effectively participates in luminal fluid modifications, including sodium resorption, and that spermatozoa, immotile in the proximal segment, acquired their motility during their transit in the terminal segment of epididymis. In *Raja eglanteria*, the glycosylation activity of the Leydig’s gland connected to epididymis and the deferent duct is rather associated to spermatozoa aggregation. During their transport from the cyst, where they were aggregate into bundles, to the posterior segment of epididymis, bundles of spermatozoa are dissociated and spermatozoa reaggregate into the seminal vesicle where they are embedded in a mucoid matrix. Two basic types of spermatozoa

aggregation are described for elasmobranchs: spermatozeugmata and spermatophores. In spermatophores, bundles of spermatozoa are embedded in a matrix with the heads inside and the flagella projected out the matrix. Spermatophores are found in Alopidae, Odontaspidae and Lamnidae. Spermatozeugmata are un-encapsulated masses of naked spermatozoa. Spermatozeugmata may consist of different architectures: simple aligned bundles of spermatozoa (*Squalus acanthias*, *Hydrolagus colliei*); radially aligned bundles of spermatozoa (*Charcharinus plumbeus*); several layers of sperm bundles (*Sphyrna lewini*).

Seasonality of spermatogenesis

Spermatogenesis can show little or no seasonal changes in Elasmobranchs, as this is the case for *S. canicula* or the ray *T. marmorata* showing continuous spermatogenesis throughout the year. But in the spiny dogfish *S. acanthias*, caught along the United States Atlantic coast, the spermatogenic cycle is interrupted by germ cell apoptosis at the mitosis–meiosis transition in April–May, leading to a zone of degeneration. By studying this zone of degeneration, several information of interest can be found. Firstly, because this interruption is temporary, the resumption of the mitosis-meiosis transition will give new cysts that will lead to a displacement of the zone of degeneration (ZD) towards the mature side of the testis. So, the observation of this zone of degeneration along the time will give an idea of the duration of spermatogenesis. In the spiny dogfish, McClusky (2005) has thus established that the spermatogenic cycle spans about 2 years and that the duration from the Preleptotene stage to the more mature spermatid stage is of 9–10 months, underlining the long time require for spermatogenesis in that shark. In terms of sperm production, the displacement of the ZD at the mature side of the testis will lead to the absence of mature cysts and consequently the decrease of sperm production 9–10 months later, in February–March of the following year. Conversely, the higher number of cysts containing mature spermatids is observed between October and January and coincide with the matting period (December to February). Secondly, this zone of degeneration was experimentally reproduced in the dogfish *S. canicula* by partial hypophysectomy coupled with an increase of temperature starvation, suggesting that this mitotic-meiosis transition is a critical stage of spermatogenesis under gonadotrophin and environmental control. Consequently, seasonality of reproduction can be more marked to species that inhabit regions where environmental conditions vary widely with season.

A ZD has also been observed in the blue shark *Prionace glauca*, the Atlantic stingray *Hypanus sabinus*, in the skate *Raja erinacea* or in the ray *Urobatis halleri* for examples. Apart from the presence or absence of a ZD, it has been reported that the relative abundance of cysts at different stages of spermatogenesis varies seasonally according to species. As observed for *S. acanthias*, higher number of cysts containing mature spermatids or higher number of spermatozoa in seminal vesicle generally correlate with the mating period for sharks. In *S. canicula* (Carcharhiniformes, wide geographic range, Northeast Atlantic) mature spermatids containing cyst increase from April through to August and the greatest number of spermatozoa per seminal vesicle was observed from March through to May in species caught in the English Channel (Garnier *et al.*, 1999). In Epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum* (Orectolobiformes, tropical, Western Pacific), higher amount of sperm storage occurs from August through to November, preceding mating period in December. In Starspotted smooth-hound *Mustelus manazo* and in Spotless smooth-hound *Mustelus griseus*, two Carcharhiniformes tropical species (Western Indian Ocean and Western Pacific), the highest number of cysts containing mature

spermatids was observed in March and May, respectively, and accumulation of spermatozoa was greatest from December through to May. In both *Mustelus* species, it appears that spermatozoa production was at maximum before the June-August mating period. Among sharks the Bonnethead *Sphyrna tiburo* (Charchariniformes, subtropical, Western Atlantic) appears as a special case since all stages of spermatogenesis are not present at all time of the year, a complete testicular regression and recrudescence is observed (Parsons and Grier, 1992). All the reports cited above concerns sharks, what about rays? In the subtropical Myliobatiforms Atlantic stingray *Hypanus sabinus* (Western Atlantic) and round stingrays *Urobatis halleri* (Eastern Pacific), inactive phase of spermatogenesis was observed from March through to July and maximum production of mature cysts in winter (from August through to January in *H. sabinus*, December in *U. halleri*) preceding spring mating period when sperm stored in seminal vesicles will be used (Tricas *et al.*, 2000). In lesser guitar fish *Rhinobatus annulatus* (Rhinopristiformes, subtropical, Southeast Atlantic), no spermatogenetic resting period was observed since all stages were found in the testes throughout the year. However, a peak in sperm production was observed from November through to January (Rossouw, 2014).

Control of spermatogenesis

In Elasmobranchs, as in other vertebrates, the testicular function is hormonally controlled via a hypothalamus–pituitary–gonadal (HPG) axis involving the GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) hypothalamic neuropeptide, pituitary gonadotropins LH (luteinizing hormone) and FSH (follicle stimulating hormone) and gonadal steroids. GnRH and gonadotropins acts by binding to their specific G-protein coupled-receptor (GnRHR, FSHR, LHR) expressed by their target cells. Three groups of GnRH (GnRH-I, GnRH-II, GnRH-III) have been identified in brain but it is classically considered that control of synthesis and release of gonadotropins is regulated by the GnRH-I localized in diencephalon. In Elasmobranchs, the transport of GnRH-I to pituitary occurs via the general circulation in absence of a direct vasculature such as the portal system found in Mammals. Gonadotropins are heteromeric glycoproteins made of one common α subunit and of one specific β subunit (β -LH or β -FSH), the three subunits have been identified in *S. canicula* (Qu erat *et al.*, 2001). However, presently, no FSH or LH receptors have been characterized in elasmobranchs, which underlines the work still to be undertaken in the elasmobranchs.

The case of Leydig cells

When testicular anatomy is presented, it is usual to present the seminiferous compartment (tubes or cysts) in which spermatogenesis occurs and the interstitial compartment, which includes the Leydig cells. This pattern is probably true for amniotes but the presence of functional Leydig cells in elasmobranchs is still questioned. In amniotes, the Leydig cell function is associated to androgen production and so what, they show an ultrastructure classically associated to steroid synthesis such as presence of mitochondria with tubular cristae, agranular endoplasmic reticulum and lipid droplets. In addition, they must also express key enzymes involved in the biosynthesis of steroids such as the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD). Leydig cells have been described as absent or present according to authors and/or stages of development and/or seasonality. For example, they have been described as absent from the interstitial tissue of

Scyliorhinus stellaris or rare in *Cetorhinus maximus* and *Scyliorhinus canicula* or present but undifferentiated in *Squalus acanthias*. Furthermore, Sertoli cells in these species show steroidal ultrastructure features and isolated cysts in *Squalus acanthias* or in *Scyliorhinus canicula* have the abilities to synthesize androgens. However, interesting studies conducted in the ray *T. marmorata* (Prisco *et al.*, 2008) has sheds new light on the question. In fact, in this species, typical Leydig cells are observed in the interstitial compartment adjacent to cysts engaged in spermatogenesis but they have reduced cellular components where they are associated to cysts containing spermatogonia and, at the other end, when they are associated to cysts engaged in spermiation. Immunolocalization of 3 β -HSD and 17 β -HSD has confirmed a distinctive stage-related involvement of cells in steroid production: spermatogonia of the early stages, Sertoli cells of cysts containing spermatogonia, Leydig cells associated to meiotic stages and Sertoli cells in late spermatids stages.

Several studies, well reviewed by (Awruch, 2013), have analyzed steroid levels in relation with the seasonal reproductive cycle and spermatogenetic stages. Briefly, androgens (mainly testosterone instead of 11-ketotestosterone) regulate development and maturation of cysts as well as the final stage of sperm maturation. Androgen receptor was primarily localized in premeiotic stages in the testis of *S. acanthias*, suggesting that androgens regulate the development of early stages of spermatogenesis (Cuevas and Callard, 1992). Among other steroids, 17 α , 20 β dihydroxyprogesterone (OHP) has been also identified and associated to cysts with late spermatids (Sourdaine and Garnier, 1993).

Conclusion

Elasmobranchs presents a remarkable male genital tract that by some aspects, appears more related to the genital tract of amniotes than of anamniote species (epididymis for example). They have also characteristic features like the close association between the testis and the epigonal tissue or the diversity of testicular cells involved in steroidogenesis. What are the evolutionary meaning of these features? Endocrine and paracrine controls of spermatogenesis is still poorly understood while knowledge on the reproduction of elasmobranchs is still a challenge because of their vulnerability.

References

- Awruch, C. A. (2013) Reproductive endocrinology in chondrichthyans: the present and the future. GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY. Elsevier Inc., 192, 60–70.
- Bosseboeuf, A. *et al.* (2014) Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). REPRODUCTION, 147(1), 125–39.
- Cuevas, M. and Callard, G. (1992) Androgen and progesterone receptors in shark (*Squalus*) testis: characteristics and stage-related distribution. ENDOCRINOLOGY, 130(4), 2173–2182.
- Garnier, D. H., Sourdaine, P. and Jégou, B. (1999) Seasonal variations in sex steroids and male sexual characteristics in *Scyliorhinus canicula*. GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 116(2), 281–90.
- Gautier, A. *et al.* (2014) Maintenance of potential spermatogonial stem cells in vitro by GDNF

treatment in a chondrichthyan model (*Scyliorhinus canicula* L.). *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 91(4), 1–15.

Gilbert, P. W. and Heath, G. W. (1972) The clasper-siphon sac mechanism in *Squalus acanthias* and *Mustelus canis*. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY -- PART A: PHYSIOLOGY*, 42(A), 97–119.

Girard, M., Rivalan, P. and Siquin, G. (2000) Testis and sperm morphology in two deep-water squaloid sharks, *Centroscymnus coelolepis* and *Centrophorus squamosus*. *JOURNAL OF FISH BIOLOGY*, 57, 1575–1589.

Loir, M. *et al.* (1995) Cell-Cell Interactions in the Testis of Teleosts and Elasmobranchs. *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE*, 32, 533–552.

McClusky, L. M. (2006) Stage-dependency of apoptosis and the blood-testis barrier in the dogfish shark (*Squalus acanthias*): Cadmium-induced changes as assessed by vital fluorescence techniques. *CELL AND TISSUE RESEARCH*, 325(3), 541–553.

McClusky, L. M. (2012) Coordination of spermatogenic processes in the testis: lessons from cystic spermatogenesis. *CELL AND TISSUE RESEARCH*, 349(3), 703–15.

Park, J. C. *et al.* (2013) Structure of the intratesticular duct system for sperm emission in the starspotted smooth-hound *Mustelus manazo*. *FISHERIES SCIENCE*, 79(2), 203–211.

Parsons, G. R. and Grier, H. J. (1992) Seasonal changes in shark testicular structure and spermatogenesis. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY*, 261(2), 173–184.

Poulakis, G. R. and Grier, H. J. (2014) Ontogenetic testicular development and spermatogenesis in rays: the Cownose Ray, *Rhinoptera bonasus*, as a model. *ENVIRONMENTAL BIOLOGY OF FISHES*, 97(9), 1013–1029.

Pratt, H. L. (1988) Elasmobranch gonad structure: a description and survey. *COPEIA*, 1988(3), 719–729.

Prisco, M. *et al.* (2008) Immunolocalization of 3beta-HSD and 17beta-HSD in the testis of the spotted ray *Torpedo marmorata*. *GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY*, 155(1), 157–63.

Pudney, J. (1995) Spermatogenesis in Nonmammalian Vertebrates. *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE*, 32, 459–497.

Pudney, J. and Callard, G. V (1986) Sertoli cell cytoplasm in the semen of the spiny dogfish *Squalus acanthias*. *TISSUE AND CELL*, 18(3), 375–382.

Quérat, B. *et al.* (2001) Duality of Gonadotropins in Gnathostomes. *GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY*, 124(3), 308–314.

Rossouw, G. J. (2014) Maturity, Spermatogenesis and Seasonal Reproductive Cycle of male *Rhinobatos annulatus* (Muller & Henle, 1841) from Algoa Bay, South Africa, and a Novel Description for Sperm Release from the Spermatocyst. *AFRICAN ZOOLOGY*, 49(1), 128–139.

Sourdaine, P. and Garnier, D. H. (1993) Stage-dependent modulation of Sertoli cell steroid production in dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY*, 97(1), 133–42.

Stanley, H. P. (1966) The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus canicula* and *Torpedo Marmorata* (Elasmobranchii). *ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG*, 75, 453–468.

Tricas, T. C., Maruska, K. P. and Rasmussen, L. E. . (2000) Annual Cycles of Steroid Hormone Production, Gonad Development, and Reproductive Behavior in the Atlantic Stingray. GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 118(2), 209–225.

Wourms, J. P. (1977) Reproduction and Development in Chondrichthyan Fishes. AMERICAN ZOOLOGIST, 17, 379–410.

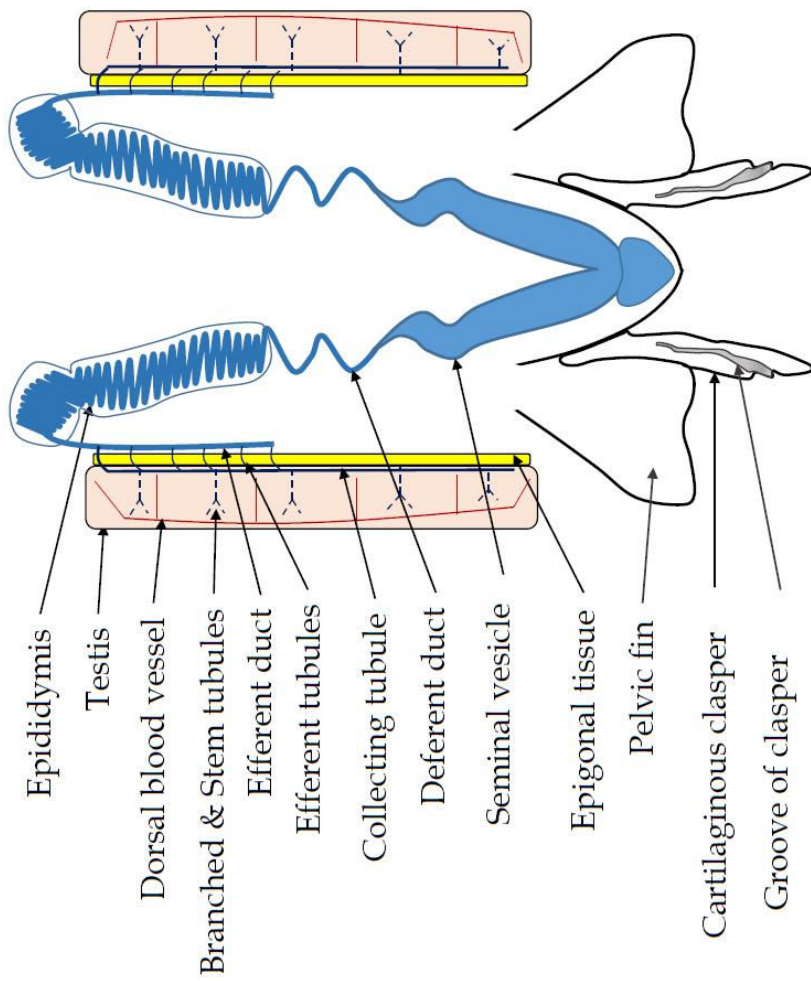
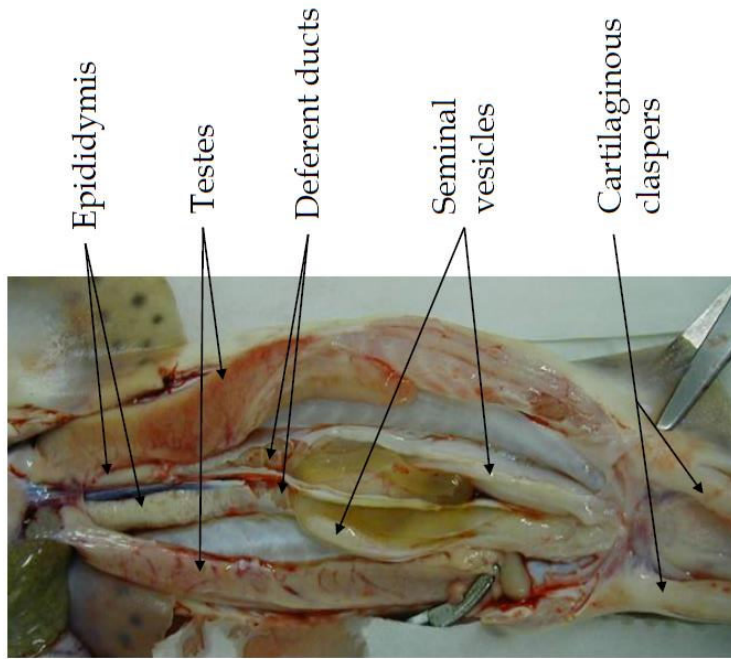


Figure 1: Illustration of the male genital tract in *Scyliorhinus canicula*

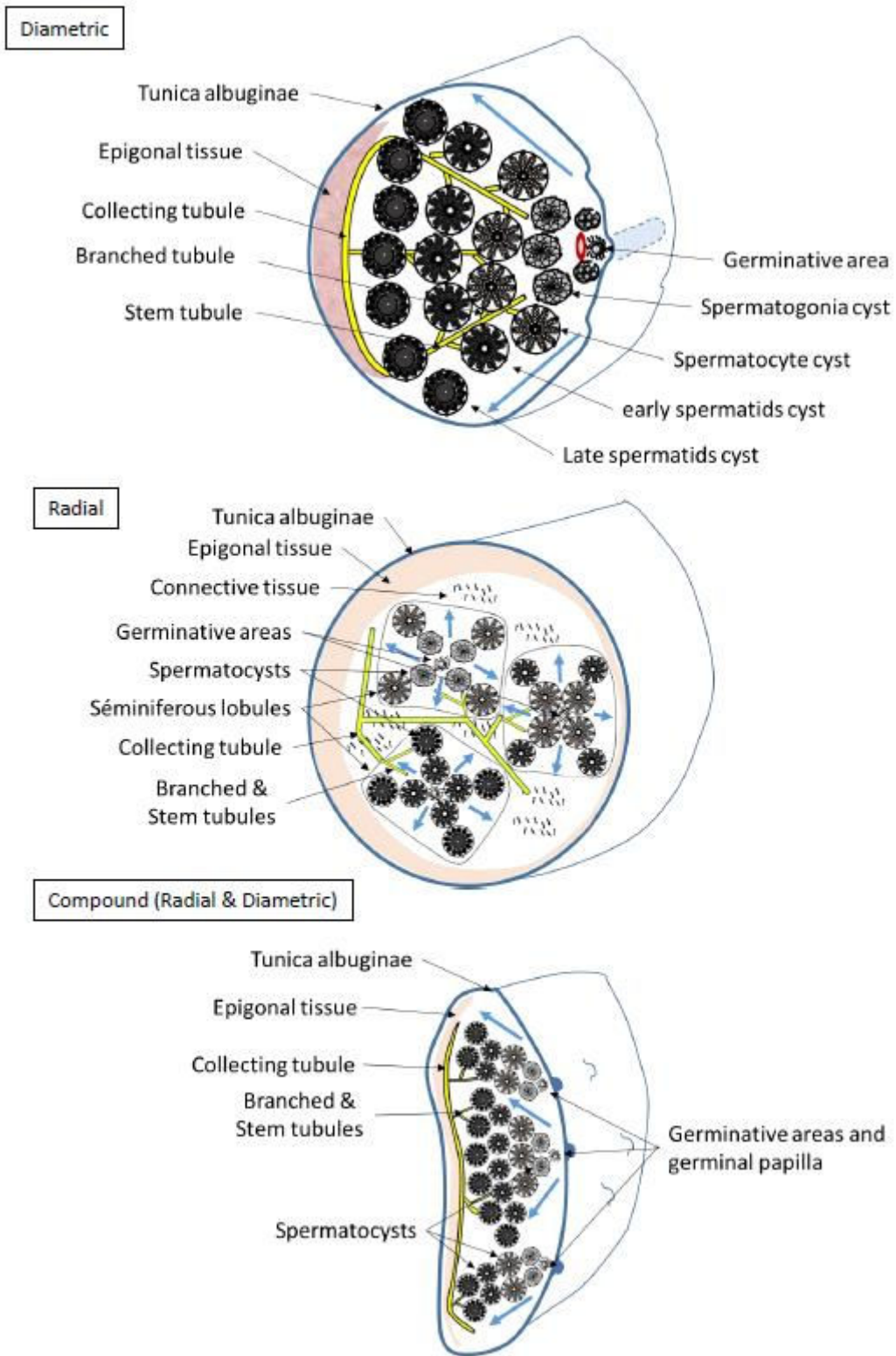


Figure 2: Anatomy of testis. Adapted from Pratt, 1988

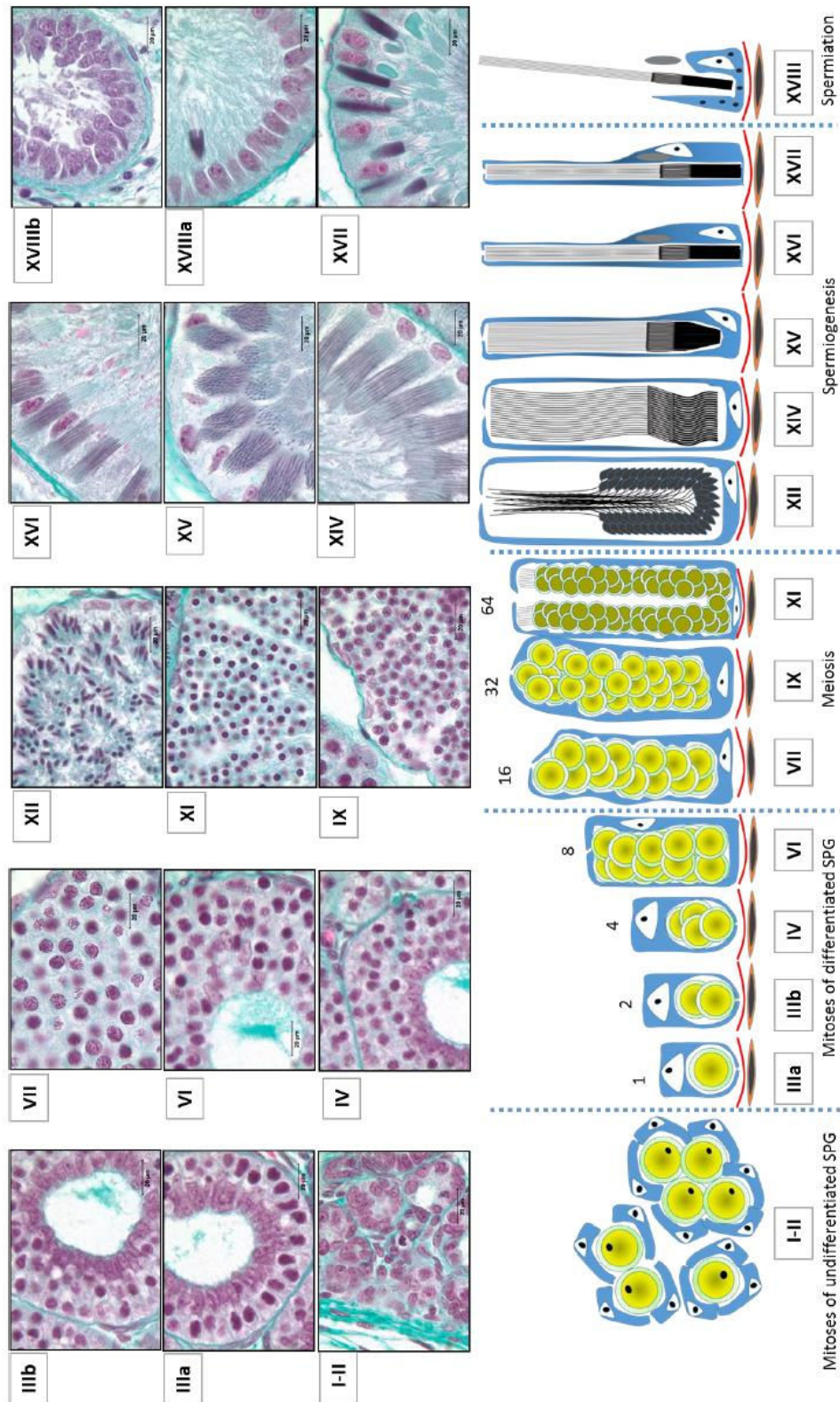


Figure 3: Stages of spermatogenesis in *Scyliorhinus canicula*. Associations between Sertoli cells (in blue) and germ cells (in yellow or black) are illustrated during stages of spermatogenesis (I to XVIII). Schemes of the evolution of a single spermatoblast in cysts containing spermatogonia (IIIa to VI), spermatocytes (VII, IX), spermatids (XI-XVIII) are represented in the lower part of the figure. Corresponding histology is in the upper part of the figure. I-II: germinative and transition zones.

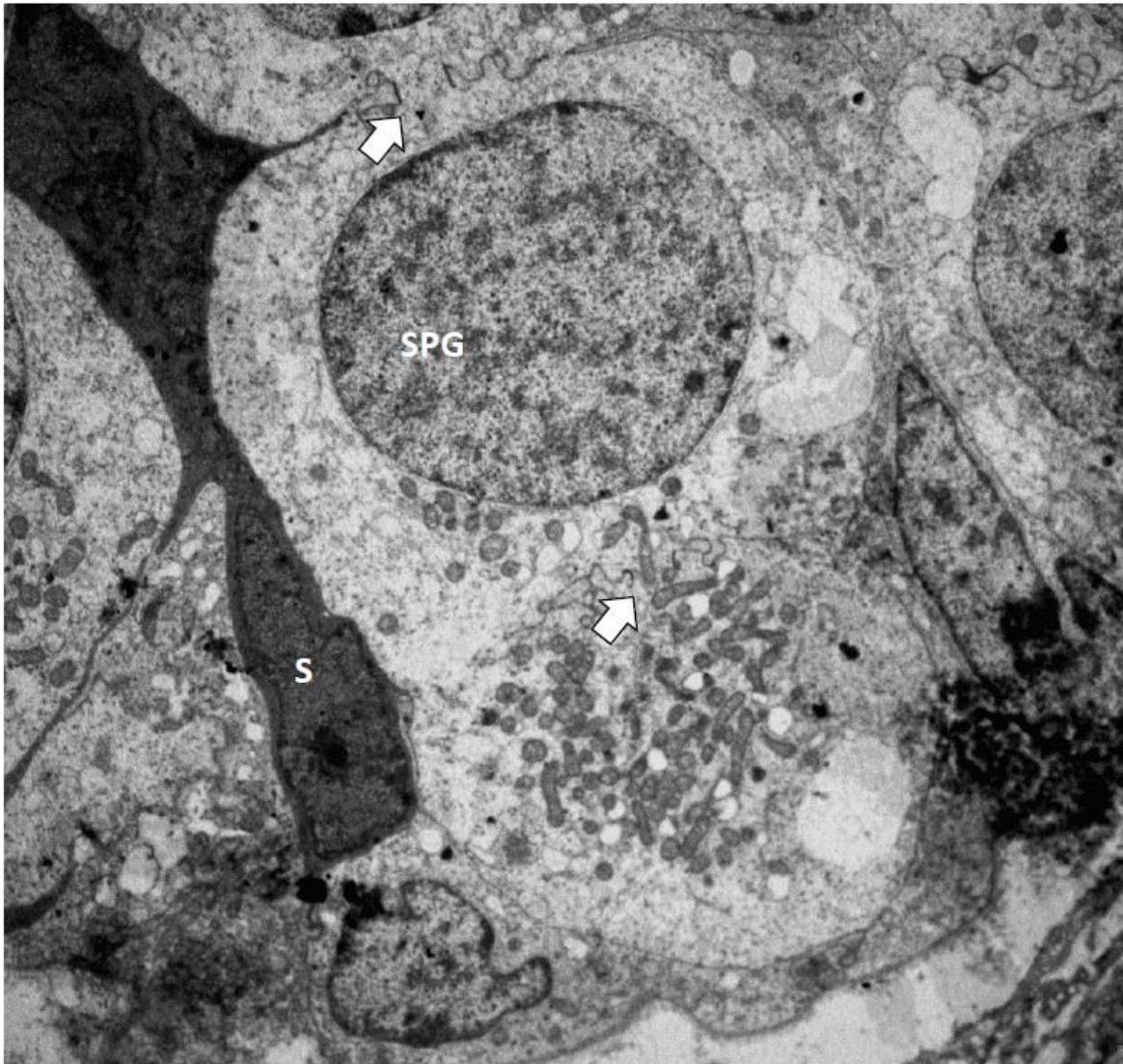


Figure 4: Ultrastructure of spermatogonia associated to Sertoli cells at stage II. Inter-cellular bridges between spermatogonia (SPG) are indicated by arrows. S: Sertoli cell.

Etablissement et maintien de la niche germinale chez la petite roussette *Scyliorhinus canicula* et analyses fonctionnelles de facteurs à potentiel thérapeutique

Les Chondrichthyens sont des espèces d'intérêt de par leur position phylogénétique à la base des Vertébrés. Au cours de cette thèse réalisée sur un petit requin, la petite roussette, l'étude des protéines Nanos, essentielles pour le maintien de la lignée germinale chez les Ostéichthyens, a mis en évidence la présence de deux protéines Nanos1 (1A et 1B) chez les Chondrichthyens, résultant d'une duplication du gène en amont des Gnathostomes. Chaque paralogue a révélé des profils d'expression spécifiques suggérant une spécification génique. De plus, la niche des spermatogonies souches (SSCs) a été mieux caractérisée et de nouveaux marqueurs de pluripotence tels que SSEA4 et Sox2 ont été détectés dans les SSCs potentielles chez cette espèce. Une culture primaire enrichie en spermatogonies de la zone germinative a montré une hétérogénéité d'expression des facteurs de SSC analysés (GFR α 1, SSEA4, POU2, Nanos1A, Nanos1B, c-Kit), suggérant une hétérogénéité des cellules souches et/ou des progéniteurs. Afin de valider le caractère souche de ces cellules en culture, un test fonctionnel de transplantation a été initié. Le développement de cette technologie, pour la première fois chez un Chondrichthyen, ouvre de nouvelles perspectives en termes de préservation de ces espèces. Enfin, la recherche de facteurs à potentiel thérapeutique au niveau testiculaire chez la petite roussette a permis l'identification d'un peptide capable de réguler la glycémie et l'insulinémie de souris présentant un diabète de type 2, mais son mode d'action reste à explorer. L'ensemble des résultats confirme l'intérêt de la petite roussette pour l'étude évolutive de la niche germinale, essentielle au maintien de la gamétogenèse, et la recherche de molécules à potentiel thérapeutique.

Mots clés : *Scyliorhinus canicula*, spermatogonies souches, transplantation, peptides, antidiabétiques

Establishment and maintenance of the germinal niche in the dogfish *Scyliorhinus canicula* and functional analysis of potential therapeutics factors

Chondrichthyes are species of interest because of their phylogenetic position at the base of the Vertebrates. In this thesis, based on a small shark, the small spotted dogfish, the study of Nanos proteins, essential for the maintenance of the germ line in Osteichthyes, showed the presence of two Nanos1 proteins (1A and 1B) in Chondrichthyes, resulting from a gene duplication upstream of the Gnathostomata. Each paralog revealed specific expression profiles suggesting a gene specification. In addition, the spermatogonial stem cells (SSCs) niche was better characterized and new pluripotency markers such as SSEA4 and Sox2 were detected in potential SSCs in this species. A primary culture of the germinative zone enriched in spermatogonia showed a heterogeneity of expression of the analysed SSC factors (GFR α 1, SSEA4, POU2, Nanos1A, Nanos1B, c-Kit), suggesting heterogeneity of stem cells and / or progenitors. In order to validate the stemness potential of these cells in culture, a functional transplantation test was initiated. The development of this technology, for the first time in a Chondrichthyes, opens new perspectives in terms of preservation of these species. Finally, the search of potential therapeutic factors in the dogfish testis led to the identification of a peptide able to regulate blood glucose and insulin levels in mice presenting type 2 diabetes, but its mode of action remains to be explored. All the results confirm the interest of the small spotted dogfish for the evolutionary study of the germinal niche, essential to the maintenance of gametogenesis, and the search for molecules with therapeutic potential.

Key words : *Scyliorhinus canicula*, spermatogonial stem cells, transplantation, peptides, antidiabetics