



HAL
open science

La suppression de Topaz1 perturbe la méiose et l'expression des ARN non-codant longs testiculaires au cours de la spermatogenèse murine.

Manon Chadourne

► To cite this version:

Manon Chadourne. La suppression de Topaz1 perturbe la méiose et l'expression des ARN non-codant longs testiculaires au cours de la spermatogenèse murine.. Reproduction sexuée. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT: 2021UPASL021 . tel-03279163

HAL Id: tel-03279163

<https://theses.hal.science/tel-03279163>

Submitted on 6 Jul 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.

La suppression de Topaz1 perturbe
l'expression de lncARNs testiculaires
au cours de la spermatogenèse
murine

*Suppression of Topaz1 disrupts meiosis and
expression of lncRNAs in the testis during
murine spermatogenesis*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568: signalisations et réseaux intégratifs en
biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat : Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED,
78350, Jouy-en-Josas, France
Réfèrent : Faculté de Médecine

**Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas,
le 29/03/2021, par**

Manon Chadourne

Composition du Jury

Gabriel LIVERA

Professeur, Université de Paris (CEA UMRE008)

Président

Brigitte BOIZET-BONHOUR

Directrice de recherche, HDR, CNRS (UMR9002)

Rapporteuse et examinatrice

Pascal FROMENT

Directeur de recherche, HDR, INRAE (UMR85, CNRS UMR7247)

Rapporteur et examinateur

Nadège VERNET

Chargée de recherche, CNRS (UMR7104, IGBM, INSERM U1258)

Examinatrice

Direction de la thèse

Eric PAILHOUX

Directeur de recherche, INRAE (BREED, UMR1198)

Directeur de thèse

Béatrice Mandon-Pépin

Chargée de recherche, INRAE (BREED, UMR1198)

Co-directrice de thèse

Pierre CALVEL

Maitre de conférence, INRAE (GABI, UMR131)

Invité

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie **Brigitte Boizet-Bonhour** et **Pascal Froment** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Je remercie également **Gabriel Livera** ainsi que **Nadège Vernet** d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail ainsi que **Pierre Calvel** d'être présent en tant qu'invité.

Je remercie **Corinne Cotinot** de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'unité BDR maintenant renommée unité BREED. Je remercie aussi les nouveaux directeurs de l'unité BREED, **Pascale Chavatte-Palmer** et **Olivier Sandra** pour avoir été disponibles et conciliants durant la période particulière de l'année 2020.

Je remercie également **Eric P.**, directeur de mon équipe d'accueil et également mon directeur de thèse. Merci pour tous les conseils avisés, les idées et les hypothèses scientifiques partagées en réunion.

Je remercie particulièrement ma co-directrice de thèse **Béatrice MP**. Béa, merci d'avoir cru en moi depuis mon stage de master 1 et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour tes conseils, tes idées et ta confiance.

Je remercie aussi **Elodie P.** pour ton soutien et tes encouragements tout au long de mon parcours dans l'équipe. Merci Elo pour tes conseils ainsi que pour ton aide précieuse pour les manip' mais aussi pour ta bonne humeur.

Merci à **Geneviève J.** pour ton aide pour le BAC-Topaz1 et les cultures cellulaires. Infatigable et persévérante, on ne t'arrête jamais ! Gégé, je te remercie d'avoir pris du temps pour m'enseigner de nouvelles techniques de labo, mais également pour ta bonne humeur et tes encouragements.

Du fond du cœur, merci **Marjolaine A.** Tout d'abord, je te remercie pour les conseils que tu m'as donnés et l'aide que tu as pu m'apporter sur le plan professionnel. Sur le plan affectif, l'amitié qui nous lie aujourd'hui est un magnifique cadeau que m'aura réservé la thèse. Sans oublier le plan sportif, je te remercie de m'avoir transmis la fièvre du badminton : je ne compte plus les matchs avec ma partenaire de double dames préférée. Enfin, merci Marjo pour ton soutien et nos fous rires.

Je remercie également toutes les autres personnes de l'équipe : **Maëlle P.** pour tes remarques constructives, tes idées et tes conseils. **Aurélié B.** pour ta gentillesse et les pauses café improvisées dans le bureau. **Eugénie C.** pour ta bienveillance. Enfin je remercie également les autres membres de l'équipe avec qui j'ai pu passer des moments agréables.

Un mot également pour les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Merci à **Luc J.** pour les analyses des données RNA-seq. Merci à **Brunot P.** et **Johan C.** pour la création de la lignée 4930463O16Rik^{-/-}. Je vous remercie également pour votre disponibilité et vos précieux conseils concernant la gestion des lignées de souris. J'ai également apprécié nos discussions de couloir ou plus rarement autour d'un café. Merci à **Eli S.** pour les analyses des paramètres spermatiques et tes conseils pour l'analyse des résultats. Enfin, je remercie le personnel des plateformes toujours disponible et à l'écoute : **Marthe V.**, **Julie R.**, **Christine L.**, **Pierre A.** ainsi que le personnel de l'animalerie rongeur.

Enfin, je souhaite remercier toute ma famille d'avoir toujours été présente et d'avoir cru en moi toutes ces années. Merci à mon **père**, ma **grand-mère** et surtout à ma petite **maman** de m'avoir permis de poursuivre mes études en région parisienne. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Un petit mot pour ma petite sœur **Léa** et mon petit frère **Simon** qui ont toujours été présents, merci d'être aussi géniaux. Merci à ma belle-famille qui pense que je suis déjantée de poursuivre si longtemps mes études.

Pour finir, **Valentin**, merci d'être à mes côtés depuis si longtemps. Ton soutien me pousse à faire de mon mieux au quotidien.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	8
PREAMBULE.....	11
INTRODUCTION	12
I. MISE EN PLACE DE L'APPAREIL GENITAL	12
A. Morphogenèse des gonades bipotentielles.....	12
1. Mise en place des crêtes génitales	12
2. Les cellules germinales primordiales	14
a. La spécification des cellules germinales :	15
b. Migration des CGP	15
B. La détermination du sexe.....	17
1. Historique	17
2. Détermination sexuelle : Rôle de SRY	20
3. La différenciation testiculaire.....	21
a. La cascade génique en aval de SRY	21
i. Activation de l'expression de Sox9	21
ii. Boucle d'autorégulation de l'expression Sox9	23
iii. Les gènes cibles de SOX9 :	24
b. Morphogenèse du testicule embryonnaire : différenciation des cellules somatiques	27
i. Différenciation des cellules de Sertoli	27
ii. Différenciation des cellules endothéliales vasculaires.....	28
iii. Différenciation des cellules de Leydig fœtales	28
iv. Différenciation des cellules myoïdes péritubulaires.....	30
v. Les autres cellules somatiques testiculaires	31
c. Inhibition de l'entrée en méiose des cellules germinales mâles	31
II. DU TESTICULE FŒTAL A LA MISE EN PLACE DE LA FERTILITE MALE	34
A. Le testicule post natal.....	34
1. Maturation des cellules de Sertoli.....	35
2. Les cellules de Leydig adultes.....	37
B. Acquisition de la fertilité du testicule : la spermatogénèse.....	38
1. La mitose	39
2. La méiose.....	42
a. Première division méiotique	43
i. Leptotène :	44
ii. Zygotène :	47
iii. Pachytène :	49
iv. Diplotène :	53
v. Diacinèse :	54
vi. Métaphase I :	55
vii. Anaphase I :	57
viii. Télophase I :	57
b. La deuxième division de méiose :	57
C. Mise en place du fuseau mitotique et méiotique : le centrosome et les microtubules.....	58
1. Le centrosome ou MTOC en mitose	58
2. Le fuseau bipolaire mitotique : la nucléation des microtubules.....	59
3. Qu'en est-il lors de la méiose ?	61
D. La spermiogénèse :	63
1. Condensation du noyau et remodelage de la chromatine	63
2. Formation de l'acrosome.....	66
3. Formation du flagelle	67
4. Réduction cytoplasmique	69

5.	Spermiation	69
E.	<i>La maturation post-testiculaire des spermatozoïdes</i>	70
1.	Le transit épидидymaire : la fonction de l'épididyme.....	70
a.	L'épididyme.....	70
b.	Remodelage du contenu spermatique	71
2.	Transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle : la capacitation.....	72
III.	LES ARNs NON CODANTS (ARNnc) :.....	73
A.	<i>Les petits ARNs non codants</i>	73
1.	Les microARNs (miARN) :.....	73
2.	Les Piwi-ARN (piARN).....	75
3.	Fragments dérivés des ARNt :	76
B.	<i>Les ARNs non codant longs</i>	77
1.	Classification des lncARNs.....	78
a.	Classification des lncARNs en fonction de leur localisation par rapport aux gènes codant pour les protéines.....	78
b.	Classification des lncARNs en fonction de leurs mécanismes d'actions.....	79
c.	Les ARNs circulaires	81
2.	Les fonctions majeures régulées par les lncARNs.....	81
a.	Les lncARNs dans l'inactivation de l'X	81
b.	L'empreinte génomique parentale et les lncARNs.....	84
c.	lncARNs impliqués dans le développement embryonnaire	87
d.	lncARNs avec un rôle architectural	87
e.	Les lncARNs impliqués dans le développement de cancers et autres maladies.....	88
C.	<i>Les lncARNs dans le testicule</i>	89
	CONTEXTE ET OBJECTIFS DE THESE	93
	ARTICLE	97
	RESULTATS COMPLEMENTAIRES	98
I.	CARACTERISATION DE PERTURBATIONS DANS LE DEROULEMENT DE LA MEIOSE CHEZ LES SOURIS TOPAZ1 ^{-/-}	98
A.	<i>Les protéines du kinétochore et du complexe de cohésines</i>	98
B.	<i>Visualisation des centrioles par MET.</i>	99
II.	CREATION D'UNE PROTEINE TOPAZ1-FLAG.....	100
A.	<i>Obtention d'un BAC contenant la totalité du gène Topaz1 de souris</i>	101
B.	<i>Validation du BAC-Topaz1 comme source de production de Topaz1 en cellules en culture.</i>	102
C.	<i>Introduction de la séquence FLAG en position C-terminale de la protéine TOPAZ1</i>	102
D.	<i>Expression du gène chimère Topaz1-FLAG dans des cellules en culture après transfection</i>	103
E.	<i>Mise en évidence d'une protéine traduite à partir du BAC-Topaz1-FLAG</i>	103
III.	CARACTERISATION DU LNCARN 4930463O16RIK	104
A.	<i>Borne exon-intron du lncARN</i>	104
B.	<i>Étude de l'extrémité 3' du lncARN 4930463O16Rik</i>	104
C.	<i>Dérégulation de l'expression de Ckap4</i>	105
	MATERIEL ET METHODES	106
I.	ETUDE HISTOLOGIQUE DES SOURIS TOPAZ1 ^{-/-}	106
A.	<i>Étalement chromosomique.</i>	106
B.	<i>Immunohistologie sur étalement chromosomique.</i>	106
C.	<i>Préparation des testicules pour la microscopie électronique à transmission</i>	107
II.	INSERTION D'UN FLAG HISTIDINE DANS LE BAC TOPAZ1 MURIN	107
A.	<i>Extraction ADN plasmidique :</i>	107
B.	<i>ADN FLAG pour la recombinaison :</i>	107
C.	<i>Création de BAC-Topaz1-FLAG :</i>	107
D.	<i>Condition de culture des cellules CHO.K1 :</i>	108
E.	<i>Transfection dans les cellules CHO.K1 :</i>	108
F.	<i>RT-qPCR :</i>	108

G.	<i>Extraction des protéines, Immunoprécipitation et Western Blot</i> :.....	108
H.	<i>Immunocytologie</i> :.....	109
I.	<i>Hybridation in situ</i>	109
III.	ETUDE DE LA LIGNEE <i>4930463O16RIK^{-/-}</i>	110
A.	<i>Extraction des ADN génomique (ADNg)</i> :.....	110
B.	<i>RT-PCR</i> :.....	110
C.	<i>RT-qPCR</i> :.....	110
DISCUSSION GENERALE.....		111
I.	ROLE DE TOPAZ1 AU COURS DE LA MEIOSE MURINE	111
A.	<i>Les modèles murins avec des phénotypes similaires à Topaz1^{-/-}</i>	111
B.	<i>Mécanismes perturbés dans les spermatocytes Topaz1^{-/-}</i>	112
1.	Stérilité liée à des anomalies de nucléations, stabilisation et/ou déstabilisation des microtubules.....	113
2.	Stérilité liée aux centrosomes.....	114
3.	Stérilité liée aux kinétochores ou au complexe de cohésines	115
II.	ROLE DES LNCARNS DANS LA FERTILITE MURINE	116
III.	HYPOTHESE D'UNE REGULATION DE CKAP4 PAR <i>4930463O16RIK</i> :.....	117
CONCLUSIONS/PERSPECTIVES		119
BIBLIOGRAPHIE.....		120
COMMUNICATIONS.....		157

LISTE DES ABREVIATIONS

A_{al}	A alignées
Ad4BP	Adrenal 4-binding protein
ADNnc	ADN non codant
Airn	Antisens Igf2r RNA
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
AMH	Anti-Mullerian hormone
A_{pr}	A appariées
AR	Acide rétinoïque
ARNnc	ARN non codant
ARX	X-linked aristaless-related homeobox gene
A_s	A souche
ATP	Adénosine-Triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
Azh	Abnormal sperm head-shape
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BMP4	Bone morphogenic protein 4
BRCA1	Breast tumor suppressor gene 1
BUB1	Budding uninhibited by benomyl
BUBR1	Mad3/Bub1 related
C-Kit	KIT Proto-Oncogene tyrosine kinase
CAPZA3	Capping actin protein of muscle Z-line subunit alpha 3
CBX2	Chromobox homolog 2
CDK1	Cycline dependant kinase 1
CENPJ	Centromere protein J
CEP152	Centrosomal protein 152
CGP	Cellule germinale primordiale
ChiP	Chromatine immunoprecipitation
ChOP	Chromatine immunoprecipitation assay
ChRIP	Chromatine RNA immunoprecipitation
Ckap4	Cytoskeleton-associated protein 4
CLEM	Correlative Ligth and Electron Microscopy
CPC	Chromosomal passenger complex
CTCF	CCCTC-binding factor
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCR4	Chemokine recepteur 4
Cyp11a	Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1
Cyp26b1	Cytochrome P450, family 26, subfamily B, member 1
DAZL	Deleted in azoospermia-like
DDX4	DEAD box polypeptide 4
DHH	Desert Hedgehog
DKK1	Dkkopf1
DMC1	Disrupted meiotic cDNA
DMR1	Differentially methylated regions 1
DMRT1	Double sex and mab-3 related transcription factor 1
Dmrt1i	Dmrt1 interacting
DSB	Double strand breaks
Dsx	Doublesex
EMI2	Early meiotic inhibitor 2
EMX2	Empty spiracles homeobox 2

Enh13	Enhancer 13
EST	Expressed Sequence Tag
FGF9	Fibroblast growth factor 9
FGFR2	Fibroblast Groth Factor Receptor 2
FOG2	Friend of GATA protein 2
FOXL2	Forkhead box L2
FSH	Hormone folliculostimulant
FSHR	Follicle stimulating hormone receptor
GATA4	GATA binding protein 4
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFRA1	GDNF family receptor- α 1
GK2	Glycérol kinase 2
GPx4	Glutathione peroxidase 4
GYKL1	Glycérol kinase-like 1
H1T	Testicular H1 histone variant
HAUS1	Homologue to augmin subunits 1
HEY1	Hairy/Enhancer-of-Split Related with YRPW Motif 1
HILS1	Spermatid-specific linker histone H1-like protein
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
HMG	High Mobility Group
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
HOOK1	Hook microtubule tethering protein 1
HOTAIR	Hox transcript antisens RNA
HOTTIP	<i>HOXA transcript at the distal tip</i>
HOX	Homéobox
HSD17B3	17 β -hydroxylase déshydrogénase type 3
HSPA2	Heat shock-related protein 2
ICE	Imprint control element
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïde
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF2R	Insulin-like growth factor 2 receptor
IME1	Inducer of meiosis 1
INCENP	Inner centromere protein
Inha	Inhibin alpha
Inhbb	Inhibin subunit beta B
Insr	<i>Insulin receptor</i>
IRT1	IME1 regulatory transcript
JAG1	JAGGED-1
jpc	<i>jours post-coïtum</i>
jpp	<i>jours post-partum</i>
Kcnq1ot1	KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1
KIF11	Kinesin family member 11
KIF2C	Kinesin family member 2C
KITL	Kit-ligand
LB	Luria Bertani
LH	Hormone lutéinisante
Lhcgr	Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
LHX9	Lim homeobox protein 9
LINC	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
LncRNA	ARN non codant long
MAB-3	Male abnormal-3
MAD1	Mitotic arrest deficient 1

MAF	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B
MBD1	Methyl-CpG-binding domain protein 1
MCRS1	Microspherule protein 1
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint 1
Mei1	Meiosis inhibitor
MEIKIN	Meiosis-specific kinetochore factor
MEIOB	Meiosis specific with OB domain
MIS	Meiosis-inducing substance
MPF	Maturation/Mitosis promoting factor
MPS	Meiosis-preventing substance
MPS1	Monopolar spindle 1
Mrhl	Meiotic recombination hot spot locus
MSCI	Meiotic sex chromosomes silencing
MSH4	MutS homolog 4
MTOC	Centre organisateur des microtubules
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MYT1	Myelin transcription factor 1
Nanog	Nanog homeobox
NANOS2	Nanos C2Hc-type zinc finger 2
Neat1	Nuclear paraspeckle assembly transcript 1
NEDD1	Neural precuresor cell expressed, developmentally downregulated gene 1
Ngn3	Neurogenin 3
ORF	Open reading frames
PACER	P50-Associated COX-2 Extragenic RNA
PAR	Pseudoautosomal region
PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PAS	Periodic Acid Schiff
PAZ	Piwi/Argonaute/Zwille
PBS	Phosphate buffer saline
PCM	Pericentriolar material
Peg1	<i>Paternally expressed gene 1</i>
PGD₂	Prostaglandine D ₂
Phkb	Phosphorylase kinase beta
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIS	Polled Intersex Syndrome
PIWI	P-element induced wimpy testis in Drosophila
PKA	Protéine Kinase A
PLK4	Polo like kinase 4
PMS2	PMS1 homolog2, mismatch repair system component
POD1	Podocyte-expressed 1
POU5F1	POU domain, class5, transcription facteur 5
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PRDM9	PR domain containing 9
Prlr	Prolactin receptor
PRM1	Protamine 1
PRMD1	PR/SET domain 1
Ptch1	Patched 1
Ptgds	Prostaglandine D synthase
RAD21L	RAD21-like
RAD51	RAD51 recombinase
RAL	Rétinaldéhyde

RALDH	Rétinaldéhydes déshydrogénases
RBP	Retinol binding protein
RISC	RNA induced silencing complex
RME2	Regulator of meiosis 2
RSPO1	Rspondin 1
SAC	Spindle assembly checkpoint
Sall4	Spalt like transcription factor 4
SAS-6	Spindle assembly abnormal protein 6
SCF	Stem cell factor
SE	Spécialisations ectoplasmiques
SF1	Steroidogenic factor 1
Slc22a2	Solute carrier family 22 member 2
Slc38a3	Solute carrier family 38 member 4
SMC1β	Structural maintenance of chromosomes 1 β
SOX2	SRY-box transcription factor
SOX9	SRY box transcription factor 9
SPEN	Spen family transcription repressor
SPO11	SPO11 initiator of meiotic double stranded breaks
SRY	Sex-determining Region of Y chromosome
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
Steel	Stem cell factor
STRA8	Stimulated by Retinoic Acide Gene 8
SVF	Sérum de veau foetal
SYCE1	Synaptonemal complex central element 1
SYCP3	Synaptonemal complex protein 3
TBC	Complexes tubulobulbaire
TCAM1	Testicular cell adhesion molecule 1
TDF	Testis determining factor
TDY	Testis Determining Y-gene
TES	Testis specific Enhancer of Sox9
TESCO	Testis-specific Enhancer of Sox9 Core Region
TEX11	Testis expressed 11
TEX12	Testis expressed sequence 12
TOPAZ1	Testis and Ovary specific PAZ domain gene 1
TP1	Transition protein 1
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
WB	Western Blot
WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4
WT	Wild Type
WT1	Wilms tumor suppressor gene 1
XCI	X chromosome inactivation
Xic	X-inactivation center
Xist	X inactive specific transcript
ZBTB16	Zinc finger and BTB domain containing 16
ZFY	Zinc finger protein Y-linked
ZFY1	Zinc finger protein 1, Y-linked
ZP3	Zona pellucida protein 3
γ-TuRCs	Gamma-tubuline ring complexes

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures :

Figure 1 : Chronologie de la formation des gonades pendant l'embryogenèse chez la souris.

Figure 2 : Schéma d'une coupe transversale d'un embryon de vertébré au début de l'organogenèse.

Figure 3 : Développement des crêtes génitales chez la souris.

Figure 4 : Migration des cellules germinales dans l'embryon murin.

Figure 5 : Modèle de régulation de l'expression de Sox9 dans les gonades XY.

Figure 6 : Les gènes cibles de SOX9.

Figure 7 : Morphogenèse du testicule embryonnaire.

Figure 8 : Représentation schématique du développement des cellules germinales dans les deux sexes chez la souris.

Figure 9 : Organisation du testicule en coupe transversale.

Figure 10 : Organisation de l'épithélium séminifère.

Figure 11 : Production des androgènes par les cellules de Leydig.

Figure 12 : Modèles de différenciation des cellules de Leydig adultes.

Figure 13 : Schéma de la spermatogenèse.

Figure 14 : Les stades de l'épithélium séminifère chez la souris.

Figure 15 : Schéma des facteurs impliqués dans la balance entre le renouvellement et la différenciation des cellules souches spermatogoniales.

Figure 16 : Schéma des étapes de prophase I.

Figure 17 : Formation du complexe synaptonémal chez la souris.

Figure 18 : Le complexe LIN/ le bouquet.

Figure 19 : Réparation des cassures doubles brins.

Figure 20 : Régulation de l'activation du MPF chez la souris (mitose et méiose).

Figure 21 : Attachement monopolaire ou bipolaire des chromosomes aux microtubules.

Figure 22 : Représentation schématique du complexe APC/C.

Figure 23 : Évolution du MTOC pendant le cycle cellulaire mitotique.

Figure 24 : Organisation des microtubules.

Figure 25 : Les populations de microtubules du fuseau méiotique.

Figure 26 : Polymérisation des microtubules indépendamment du centrosome au cours de la mitose.

Figure 27 : Les étapes de la spermiogénèse.

Figure 28 : Représentation schématique d'un spermatozoïde de souris.

Figure 29 : Schéma des étapes de spermiation.

Figure 30 : Schéma de l'épididyme sur une coupe transversale d'un testicule.

Figure 31 : Biogenèse des miARNs.

Figure 32 : Expression des protéines PIWI au cours du développement des cellules germinales mâles chez la souris.

Figure 33 : Biogenèse et classification des fragments dérivés des ARNt.

Figure 34 : Classification des lncARNs en fonction de leurs localisations par rapport aux gènes codants pour des protéines.

Figure 35 : Biogenèse des ARNs circulaires (ARNcirc).

Figure 36 : Le centre inactivateur de l'X (Xic) et le gène Xist.

Figure 37 : Régulation de l'expression de *Igf2*, *Slc38a4* et *Peg1* par H19.

Figure 38 : Locus à empreinte génomique *Kcnq1*.

Figure 39 : Complexes Hox chez la souris.

Figure 40 : Rôle structurel de *Neat1* dans la formation des « paraspeckles » nucléaires.

Figure 41 : Les lncARNs associés à différents types de cancers.

Figure 42 : Exemple de lncARNs ayant un rôle décrit au cours de la spermatogenèse des mammifères.

Figure 43 : Profil d'expression de *TOPAZ1/Topaz1* dans les gonades ovines et murines.

Figure 44 : Coloration Hématoxyline et éosine de coupes de testicules issus de souris *Topaz1^{+/+}* et *Topaz1^{-/-}*.

Figure 45 : Double immunomarquage sur étalements chromosomiques de spermatocytes I.

Figure 46 : Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de spermatocyte WT.

Figure 47 : Représentation schématique de la séquence ADN du BAC-*Topaz1*.

Figure 48 : Expression relative des transcrits *Topaz1* et *Tcaim* dans les cellules CHO.K1.

Figure 49 : Fragment de recombinaison homologue.

Figure 50 : Migration sur gel des amplifications PCR du BAC-*Topaz1*-FLAG.

Figure 51 : Transcription des gènes du BAC *Topaz1*-FLAG dans les cellules CHO.K1.

Figure 52 : Immunofluorescence avec l'anticorps anti-FLAG des cellules CHO.K1 transfectées.

Figure 53 : Western blot dirigé contre la séquence FLAG.

Figure 54 : Étude du transcrit 4930463O16Rik et de son épissage.

Figure 55 : Schéma de l'ADNg de l'exon 4 de 4930463O16Rik jusqu'au gène 1700092E16Rik avec les couples d'amorces utilisés.

Figure 56 : Transcription dans la région 3' de 4930463O16Rik et expression de *Ckap4*.

Figure 57 : Expression dynamique de *Ckap4* dans différents tissus.

Liste des tables :

Table 1 : Les mécanismes fonctionnels et la localisation génomique des lncARNs.

Table 2 : Liste des anticorps utilisés sur des étalements chromosomiques.

Table 3 : Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR et RT-qPCR.

PREAMBULE

L'équipe de recherche, dans laquelle j'ai réalisé mes travaux de thèse, étudie la différenciation des gonades de mammifères en conditions normales ou perturbée (pathologique, environnementale). Le gène d'intérêt *TOPAZ1/Topaz1* d'abord mis en évidence chez la brebis, a par la suite été étudié chez la souris (Baillet *et al.*, 2011a). Spécifiquement exprimé dans les gonades dans les espèces ovine et murine, le gène *Topaz1* se révèle indispensable pour permettre la fertilité des souris mâles. Plus précisément, il a été mis en évidence que *Topaz1* est essentiel lors de la méiose I, étape clé de la spermatogenèse (événements de différenciation des spermatozoïdes). Une étude transcriptomique par puce à ADNc (microarray) a mis en évidence une proportion importante (10%) d'ARNs non-codants longs (lncARNs) dérégulés dans le testicule murin en absence de *Topaz1* (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015)

Le premier objectif de ma thèse a été de poursuivre l'étude du modèle murin *Topaz1*^{-/-}. Pour cela, nous avons réalisé une analyse transcriptomique dit haut débit (RNA-sequencing ou RNA-seq) de l'ensemble des gènes exprimés dans le testicule de souris dépourvue ou non de *Topaz1* à deux stades de développement : à 16 *jpp* (jours *post-partum*, soit avant le blocage méiotique des souris *Topaz1*^{-/-}) et 18 *jpp* (après le blocage méiotique). Des analyses histologiques ont été menées en parallèle pour comparer le phénotype testiculaire entre les animaux normaux et *Topaz1*^{-/-}.

Le deuxième objectif de ma thèse concerne l'étude des lncARNs dérégulés dans le testicule murin en absence de *Topaz1*. Pour cela, l'étude de l'un d'entre eux, *4930463O16Rik*, a été réalisée grâce à la lignée délétée pour ce gène. Le phénotype de cette lignée de souris a été étudié et une étude du transcriptome testiculaire a été réalisée par RNA-seq dans le but de déterminer le rôle du lncARN *4930463O16Rik*.

Dans ce manuscrit, les deux premières parties de l'introduction bibliographique reprennent les étapes fondamentales de la mise en place d'un testicule fonctionnel (essentiellement chez la souris). Ainsi, dans un premier temps, la mise en place de l'appareil génital avec la formation des gonades bipotentielles et la différenciation du sexe seront abordées. Dans un deuxième temps, le développement du testicule post-natal et l'acquisition de la fertilité mâle seront décrits. Ainsi je détaille les étapes de formation des spermatozoïdes dans le testicule jusqu'à la maturation post testiculaire des spermatozoïdes. Enfin, la dernière partie introduira les fonctions des ARNs non-codants, plus particulièrement la fonction des lncARNs.

INTRODUCTION

I. Mise en place de l'appareil génital

L'identité d'un individu est déterminée, en partie, par son sexe. Le sexe mâle ou femelle se met en place dans l'embryon puis le fœtus grâce à une cascade d'événements permettant la différenciation des gonades. Cette différenciation se déroule en 3 étapes : dans un premier temps, le sexe génétique est déterminé par les chromosomes sexuels apportés par les gamètes paternel et maternel lors de la fécondation. Puis, c'est durant la vie embryonnaire que s'établit le sexe gonadique qui correspond à la différenciation des ovaires ou des testicules. Ces différentes étapes permettent la mise en place du sexe phénotypique (ou somatique) correspondant aux caractères sexuels primaires (gonades, tractus génital, organes génitaux externes et éléments du système nerveux central) et aux caractères sexuels secondaires (pilosité, comportement sexuel, maturité des organes sexuels). Les caractères sexuels secondaires apparaissent sous l'action de différentes hormones à partir de la puberté.

La formation des crêtes génitales démarre à partir de 9,5jpc (*jours post-coïtum*) chez la souris et au cours de la 5^{ème} semaine de développement chez l'homme. Chez les mammifères, même si le sexe de l'embryon est déterminé dès la fécondation, les gonades embryonnaires présentent le même aspect morphologique jusqu'à 12jpc chez la souris et 7 semaines chez l'homme. La gonade durant cette période est dite indifférenciée ou « bipotentielle ». La différenciation gonadique vers un testicule ou un ovaire se déroule plus tard dans le développement embryonnaire.

A. Morphogenèse des gonades bipotentielles

Lors du développement de l'appareil génital, il y a un rapport étroit entre le développement du système uro-génital et la formation des gonades. Les ébauches gonadiques se forment à partir du mésonéphros qui est un rein embryonnaire transitoire. Puis les cellules germinales primordiales (CGP) migrent jusqu'aux ébauches en formation et colonisent la gonade (**Figure 1**).

1. Mise en place des crêtes génitales

Chez les mammifères, c'est au niveau de la face ventrale du mésonéphros, située de chaque côté du mésentère intestinal, que commence la formation des crêtes génitales (**Figure 2**) avec l'épaississement par prolifération cellulaire de l'épithélium cœlomique monocouche (**Figure 3A-B**). La membrane basale sous-jacente à l'épithélium cœlomique se fragmente et permet aux cellules de l'épithélium cœlomique en prolifération de migrer dans la région du mésenchyme interne dorsal. Ces cellules épithéliales subissent alors une transition mésenchymateuse. C'est au niveau de ce tissu

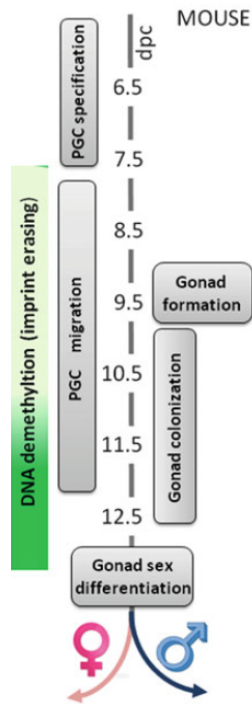


Figure 1 : Chronologie de la formation des gonades pendant l'embryogenèse chez la souris.
D'après De Felici, 2016.

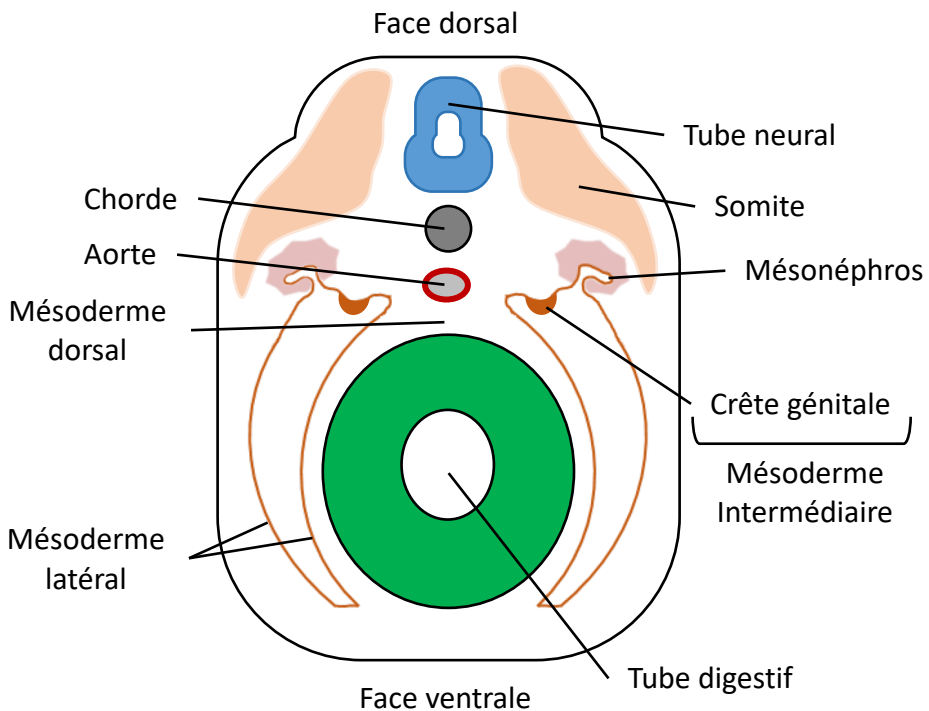


Figure 2 : Schéma d'une coupe transversale d'un embryon de vertébré au début de l'organogenèse.

pluristratifié que les cellules germinales primordiales vont migrer, vers 10 *jpc* (**Figure 3C-D**). Chez la souris, les crêtes génitales indifférenciées sont alors complètement formées à 12*jpc*.

L'expression du facteur de transcription GATA4 (pour *GATA binding protein 4*) est indispensable pour l'initiation de la formation des crêtes génitales. Les souris, présentant une invalidation conditionnelle de *Gata4* induit à 8,75 *jpc*, présentent un défaut d'épaississement de l'épithélium cœlomique et une absence de fragmentation de la membrane basale soulignant le rôle de GATA4 dans ces 2 évènements (Hu *et al.*, 2013). GATA4 est nécessaire pour l'expression de deux autres facteurs de transcription dans l'épithélium cœlomique des crêtes génitales: SF1 (*Steroidogenic factor 1* aussi appelé *Ad4BP* (*Adrenal 4-binding protein*) ou *Nr5a1* (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*)) est détecté dès 9 *jpc* dans l'épithélium et le mésenchyme des crêtes urogénitales et LHX9 (*Lim homeobox protein 9*) est présent dans les crêtes génitales dès 9,5 *jpc* chez la souris (Birk *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2013; Ikeda, 1996). Ces deux facteurs jouent un rôle essentiel dans la croissance et le maintien des crêtes génitales. L'absence du récepteur nucléaire SF1 murin entraîne un défaut de formation des crêtes génitales (de tailles réduites à 12*jpc*, les gonades ne sont plus visibles à 12,5*jpc*) ainsi qu'une inversion du sexe des souris XY : les souris meurent dans les 8 jours suivant la naissance dû à un déficit d'hormones corticosurréaliennes (Ikeda, 1996; Luo *et al.*, 1994). Les souris *Lhx9*^{-/-} présentent une absence de gonades à 13,5 *jpc* bien que les crêtes génitales se forment normalement. En effet, chez ces mutants, aucune prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique n'a été observée à 11,5 *jpc*. L'absence de gonades entraîne une inversion du sexe chez les souris mutantes XY : ces animaux présentent des organes génitaux femelles atrophiés (Birk *et al.*, 2000). Ainsi LHX9 est primordial pour la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique des crêtes génitales.

Les facteurs de transcription WT1 (pour *Wilms tumor suppressor gene 1*) et EMX2 (pour *Empty spiracles homeobox 2*) ne dépendent pas de GATA4 pour leurs expressions mais ils sont indispensables pour la formation des crêtes génitales (Hu *et al.*, 2013). *Wt1* est exprimé à partir de 9 *jpc* dans le mésoderme intermédiaire puis dans les crêtes urogénitales à 9,5 *jpc* (Armstrong *et al.*, 1993). L'invalidation totale de *Wt1* est létale dans l'embryon murin entre 13*jpc* et 15*jpc* : les embryons présentent une dysgénésie totale des reins, et des gonades ainsi que des malformations du thorax et du cœur. L'étude de ces embryons mutants a mis en évidence des crêtes génitales plus petites à 12*jpc* puis l'absence de gonades, visible dès 14*jpc*, dû à un défaut de multiplication des cellules de l'épithélium cœlomique (Kreidberg *et al.*, 1993). Le même phénotype est observé chez les souris *Emx2*^{-/-}, conséquence d'une mauvaise transition des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (Kusaka *et al.*, 2010).

Suite à l'épaississement de l'épithélium cœlomique, l'expression de SF1 est modulée négativement pour permettre la croissance des crêtes génitales. Les facteurs tels que POD1 (pour *Podocyte-*

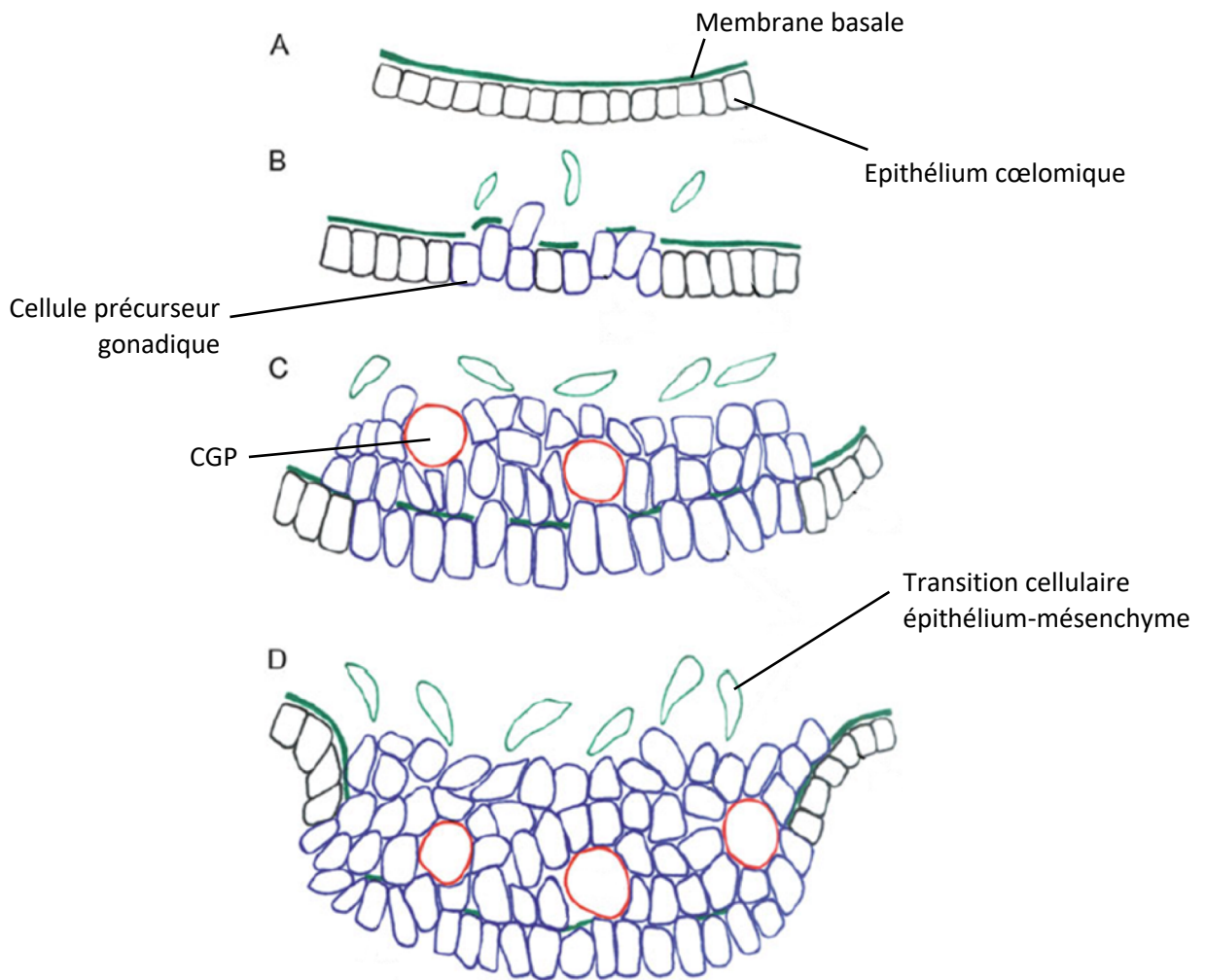


Figure 3 : Développement des crêtes génitales chez la souris.

(A) L'épithélium cœlomique recouvre le mésonéphros et sont séparés par une membrane basale. **(B)** Sous l'influence des facteurs de transcription GATA4 puis SF1, les cellules de l'épithélium cœlomique deviennent les précurseurs gonadiques. Elles vont proliférer alors que la membrane basale se fragmente. **(C)** Les cellules en prolifération migrent dans la région du mésentère dorsal et forment un tissu pluristratifié. Certaines cellules réalisent alors une transition de cellules épithéliales à cellules mésenchymateuses. Les premières cellules germinales primordiales (CGP) arrivent dans l'ébauche gonadique. **(D)** La gonade continue sa croissance et les CGP continuent d'envahir la gonade. D'après Priprek *et al.*, 2016.

expressed 1 ou *Tcf21* pour *transcription factor 21*) et CBX2 (pour *chromobox homolog 2* aussi appelé M33) sont impliqués dans cette régulation. La mutation de *Pod1* ou *Cbx2* chez la souris entraîne la formation de crêtes génitales hypoplasiques dans les deux sexes ainsi qu'une féminisation des organes génitaux externes et une inversion du sexe chez les animaux XY *Cbx2*^{-/-} (Cui *et al.*, 2004; Katoh-Fukui *et al.*, 2012). *Pod1* est exprimé dans les crêtes génitales à partir de 11,5 *jpc* chez la souris. Les embryons invalidés pour *Pod1*, suite à l'insertion d'un rapporteur β-galactosidase qui remplace le premier exon de *Pod1*, présentent une augmentation de l'expression de *Sf1* dans l'épithélium cœlomique et dans la jonction gonade-mésonephros. Ces deux régions expriment *Pod1* chez des individus WT (Wild Type). La présence du rapporteur β-galactosidase montre que *Sf1* est exprimé dans les mêmes cellules qui expriment *Pod1* (Cui *et al.*, 2004). Ainsi ces résultats démontrent qu'en absence de *Pod1*, *Sf1* s'exprime de façon ectopique dans les cellules exprimant normalement *Pod1*. Cette expression ectopique de SF1 entraîne une différenciation prématurée ou excessive des cellules stéroïdogéniques qui résulte en un défaut de développement des crêtes génitales (Cui *et al.*, 2004). Les embryons de souris *Cbx2*^{-/-} présentent une diminution de l'expression de plusieurs gènes comprenant *Sry* (pour Sex-determining Region of Y chromosome), *Sox9* (*SRY box 9*) et *Sf1* (Katoh-Fukui *et al.*, 2012). Le phénotype d'inversion du sexe chez les souris XY a été restauré en sur-exprimant *Sry* et *Sox9* dans les gonades *Cbx2*^{-/-} : les testicules chez ces individus sont hypoplasiques. Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle de *Cbx2* dans la prolifération des précurseurs gonadiques (Katoh-Fukui *et al.*, 2012). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) *in vitro* ont mis en évidence que CBX2 lie directement le promoteur de *Sf1* (Katoh-Fukui *et al.*, 2005). Il est donc suggéré que la régulation de la croissance des crêtes génitales par CBX2 passe par la régulation de l'expression de *Sf1*.

Pendant la croissance des crêtes génitales, les CGP vont envahir celle-ci. Néanmoins, la formation des crêtes génitales n'est pas nécessaire pour la migration des CGP au niveau de l'épithélium cœlomique. L'absence des gènes *Gata4*, *Sf1*, *Lhx9*, *Wt1* et *Emx2* ne perturbe pas la migration des CGP. Lorsque les CGP ont envahi les crêtes génitales, on parle alors d'ébauches gonadiques bipotentielles ou indifférenciées puisqu'elles ont le même aspect morphologique dans les deux sexes. Cette gonade bipotentielle est donc majoritairement composée de trois types cellulaires : les cellules dérivées de l'épithélium cœlomique, les cellules dérivées du mésonephros et les CGP.

2. Les cellules germinales primordiales

Chez les mammifères, la mise en place et la différenciation des CGP sont des étapes primordiales pour l'établissement du stock de cellules germinales (futur ovocytes ou spermatozoïdes) et donc la fertilité d'un individu. La différenciation des CGP se déroule dans un ordre chronologique précis et une fenêtre de temps réduite qui peut être divisée en 3 grandes étapes : (i) la spécification des cellules germinales à partir des cellules somatiques environnantes, (ii) la migration des CGP des

territoires extra-gonadiques jusqu'aux crêtes génitales, (iii) la prolifération des CGP pour former les premières structures des gonades. Enfin, la différenciation sexuelle des CGP est déterminée selon l'environnement testiculaire ou ovarien.

a. La spécification des cellules germinales :

L'induction des CGP à lieu dans les cellules pluripotentes de l'épiblaste proximal. La molécule de signalisation BMP4 (bone morphogenic protein 4) produite de façon uniforme par l'ectoderme extra-embryonnaire agit sur les cellules épiblastiques pour induire la spécification des CGP vers 5.5 jpc chez la souris. *Wnt3* (Wnt family member 3), produit dans l'épiblaste, assure la réceptivité de ce dernier au facteur de croissance BMP4. Ces deux facteurs sont primordiaux pour la différenciation des CGP puisque des embryons déficients pour *Wnt3* ou *Bmp4* présentent une absence de formation des CGP (Lawson *et al.*, 1999; Ohinata *et al.*, 2009).

Ainsi, le signal BMP4 entraîne la différenciation d'une partie des cellules de l'épiblaste proximal de l'embryon en CGP qui commencent alors à exprimer les gènes *Prmd1* (pour *PR/SET domain 1* ou *Blimp1* pour *B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1*) (Ohinata *et al.*, 2005) et *Prdm14* (Yamaji *et al.*, 2008). *Prmd1* et *Prdm14*, exprimés respectivement à partir de 6,25 et 6,75 jpc chez la souris, sont les marqueurs les plus précoces des CGP. Des embryons de souris *Prmd1*^{-/-} présentent une forte diminution du nombre de CGP (Ohinata *et al.*, 2005). Ces observations attestent d'un défaut de spécification des CGP en absence de *Prmd1*. L'inactivation de *Prdm14* entraîne une diminution du nombre de CGP formées traduisant un défaut de spécification des CGP (Yamaji *et al.*, 2008). L'expression de *Prmd1* puis de *Prdm14* dans les mêmes cellules entraîne une répression des gènes somatiques (répression des gènes de la famille Hox : *Hoxa1*, *Hoxa2*) ainsi qu'une ré-acquisition de l'état de pluripotence (expression de *Sox2* (pour SRY-box transcription factor), *Pou5f1* (pour POU domain, class5, transcription facteur 5 ou *Oct4* pour Organic catio/carbitine transporteur 4) et de *Nanog* (pour *Nanog homeobox*)) (Saitou *et al.*, 2002; Yabuta *et al.*, 2006). En parallèle, ces derniers entraînent la spécification d'une quarantaine de CGP qui sont alors détectées grâce à leur activité phosphatase alcaline et à l'expression de *Stella* ou *Dpp3* (developmental pluripotency-associated 3) à partir de 7,25 jpc dans le mésoderme extra-embryonnaire. L'activité phosphatase alcaline et l'expression de *Stella* sont des marqueurs des CGP spécifiées (Ginsburg *et al.*, 1990; Saitou *et al.*, 2002).

b. Migration des CGP

Une fois spécifiées, les CGP migrent de l'épiblaste vers les crêtes génitales. Ainsi, chez la souris, les CGP se déplacent à travers la ligne primitive postérieure pour envahir l'endoderme définitif et les structures extra-embryonnaires postérieures (comme l'allantoïde) de 7,5 à 8,25 jpc (Molyneaux and Wylie, 2004) (**Figure 4A**). Le devenir des cellules germinales dans les structures extra-embryonnaires

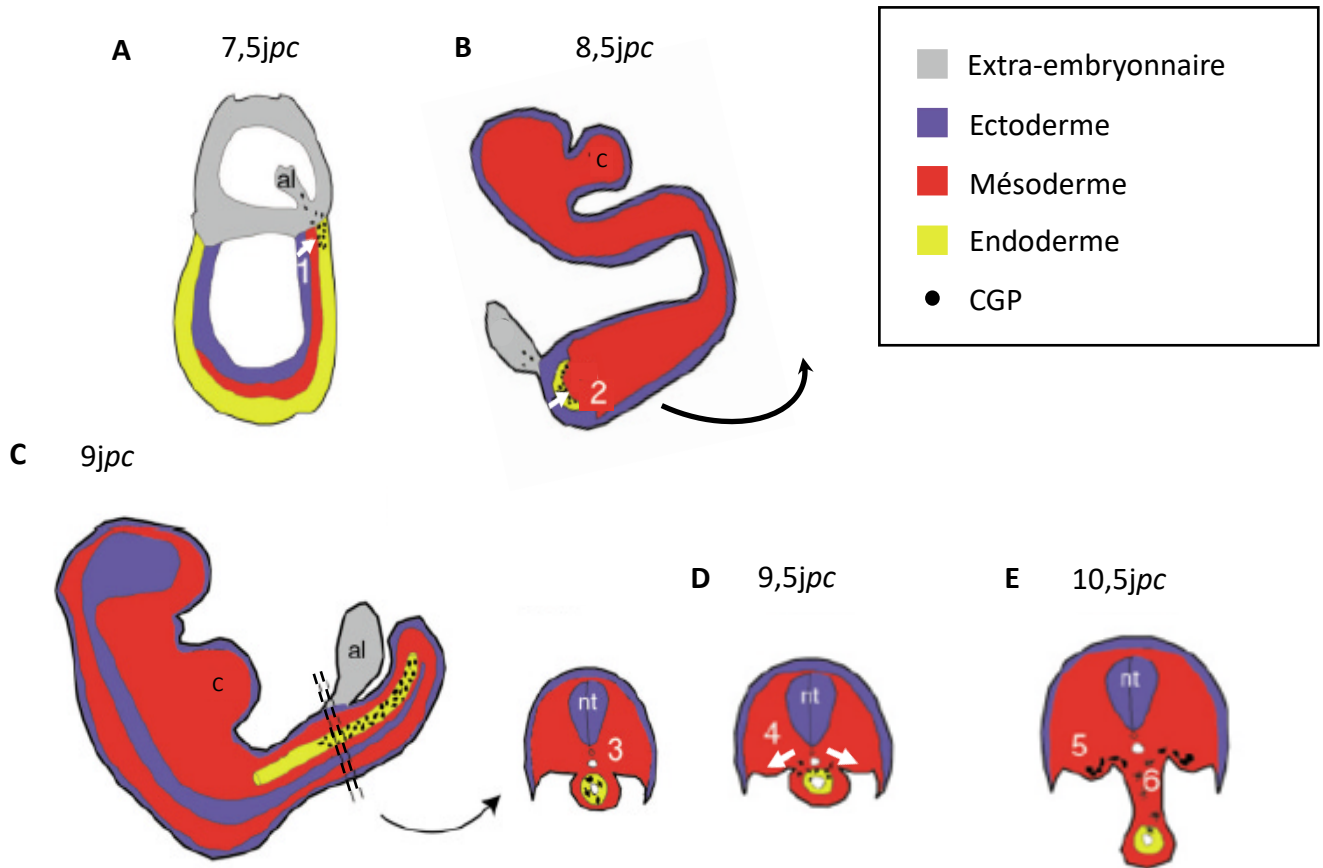


Figure 4 : Migration des cellules germinales dans l'embryon murin.

La migration des CGP peut être divisée en 3 étapes successives. Les flèches blanches indiquent le sens de mouvement des CGP. **(A)** Pendant la gastrulation, les cellules germinales différenciées émigrent de l'épiblaste proximal et envahissent principalement l'endoderme définitif mais des CGP sont aussi retrouvées dans l'endoderme pariétal ou l'allantoïde. **(B)** Au cours de la deuxième étape, les CGP issues de l'endoderme définitif sont incorporées au niveau de la face ventrale de la poche de l'intestin. Durant cette période, les mouvements morphogénétiques rendent l'observation des CGP difficile. **(C)** A partir de 9 jpc, l'intestin s'allonge et forme un tube. Les CGP se redistribuent dans toute la circonférence du tube de l'intestin postérieur : c'est l'étape 3. **(D)** A 9,5 jpc, les cellules émigrent du côté dorsal de l'intestin pour rejoindre les crêtes génitales en développement (étape 4). **(E)** Les premières CGP envahissent les crêtes génitales. Les CGP sont organisées en clusters et forment des réseaux de cellules en migration. La majorité des cellules germinales ont atteint les crêtes génitales à 11,5jpc. Abréviations : al, allantoïde ; c, cœur ; nt, tube neural.

D'après Molyneaux et Wylie, 2004.

n'est pas connu. Les cellules ayant envahi l'endoderme définitif sont incorporées au niveau de la face ventrale de l'intestin postérieur vers 8,5 *jpc* (Molyneaux *et al.*, 2001) (**Figure 4B**). Ainsi, entre 7,5 et 8,5 *jpc*, la morphologie ronde des CGP et la présence occasionnelle de petites projections de pseudopodes tendent à dire que l'invasion de l'intestin postérieur par les CGP serait d'abord un processus passif (Anderson *et al.*, 2000). De plus, les mouvements morphogéniques de l'embryon à cette période (entre 7,5 et 8,5 *jpc*) rendent difficile l'observation de la migration des CGP. A 9 *jpc*, les cellules migrent activement à partir de la face ventrale de l'intestin et se redistribuent dans toute la circonférence du tube de l'intestin postérieur (**Figure 4C**). Enfin, vers 9,5 *jpc*, les CGP commencent à sortir du côté dorsal de l'intestin pour se diviser en deux flux et migrer de façon active vers l'emplacement des crêtes génitales en développement (Molyneaux *et al.*, 2001) (**Figure 4D-E**). Les CGP émigrées de l'intestin présentent des pseudopodes leur permettant de s'agréger entre elles (Gomperts *et al.*, 1994). A 11,5 *jpc* la majorité des CGP ont atteint les crêtes génitales en croissance, néanmoins, toutes les cellules ayant initié la migration n'atteindront pas celles-ci. Durant la migration, les CGP vont également se multiplier, essentiellement entre 9,5 et 10,5 *jpc*, en passant d'une centaine à environ 25000 CGP (Tam and Snow, 1981). A 11,5 *jpc*, quand elles sont arrivées dans les crêtes génitales, les CGP perdent leurs motilités ainsi que leurs pseudopodes. Elles ont alors une forme arrondie et sont agrégées entre elles (Gomperts *et al.*, 1994).

Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans la migration des CGP jusqu'aux crêtes génitales, notamment le récepteur tyrosine kinase c-Kit (KIT Proto-Oncogene tyrosine kinase) codé par le locus « Dominant White-Spotting » (W). Son ligand, KITL (Kit Ligand) ou facteur Steel (Stem cell factor) codé par le locus *Stell* (*Sl*), est exprimé dès 7,5 *jpc* dans l'endoderme primitif pour assurer la survie des CGP. L'absence du ligand KITL ou du récepteur c-Kit est létal à la naissance chez la souris et ces animaux sont stériles avec une absence de CGP gonadique (Bernex *et al.*, 1996). Durant la migration des CGP, l'absence de KIT et KITL entraîne une diminution du nombre de CGP (Buehr *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 2009). Ainsi, KIT et KITL sont essentiels pour la prolifération, la survie et la migration des CGP dans l'intestin primitif. Le couple CXCL12 (pour *Chemokine (C-X-C motif) ligan 12* ou SDF1 (*Stromal cell-derived factor 1*)) et son récepteur CXCR4 (pour *Chemokine récepteur 4*) sont également nécessaires pour la migration des CGP. CXCR4 est présent à la surface des cellules germinales alors que CXCL12 est sécrété par les crêtes génitales et le mésenchyme : leurs interactions sont nécessaires pour une migration adéquate de la face dorsale de l'intestin postérieur vers les crêtes génitales (Ara *et al.*, 2003; Molyneaux *et al.*, 2003). Enfin, il apparaît essentiel que les cellules somatiques, dont la matrice extracellulaire environnante, participent au guidage des CGP (Gomperts *et al.*, 1994). Bendel-Stenzel *et al.* (2000), ont mis en évidence que les E-cadhérines permettent l'adhésion des CGP les unes aux autres quand elles migrent de l'intestin aux crêtes génitales (Bendel-Stenzel *et al.*, 2000).

Une fois arrivées dans les crêtes génitales, les CGP se mettent à exprimer deux nouveaux gènes spécifiques nommés *Ddx4* (pour *DEAD box polypeptide 4 aussi appelé MVH pour mouse vasa homolog gene* ou *VASA*) et *Dazl* (pour *deleted in azoospermia-like*). Chez la souris, l'expression de *Ddx4* est détectée dans les CGP à partir de 10,5 *jpc* dans les deux sexes. Tanaka *et al.* (2000) ont mis en évidence le rôle de DDX4 dans la prolifération et la différenciation des CGP mâles. L'invalidation de *Ddx4* se manifeste plus tard par un blocage méiotique, même si les effets sur la réduction du nombre de CGP sont visibles à 12,5 *jpc* dans la gonade fœtale mâle. Seules les souris KO *Ddx4* mâles sont stériles (Tanaka *et al.*, 2000). *Dazl* est exprimé dans les cellules germinales des deux sexes à partir de 11,5 *jpc*. L'invalidation de *Dazl* chez la souris entraîne une diminution de l'expression des marqueurs des cellules germinales (*Oct4*, *Ddx4*, *Stella*) à 14,5 *jpc* ainsi qu'une augmentation de l'apoptose de ces cellules à 15,5 *jpc* dans les gonades XY. La suppression de *Dazl* résulte en une absence de cellule germinale XY à la naissance (Lin and Page, 2005). Ainsi, DAZL réprime l'apoptose des cellules germinales (Chen *et al.*, 2014; Lin and Page, 2005). Ultérieurement, il permet également aux CGP de devenir compétentes aux signaux mâle ou femelle (Gill *et al.*, 2011). Plus tard dans ce manuscrit, nous aborderons aussi le rôle de DAZL dans l'entrée en méiose des cellules germinales (**voir partie Introduction.II.B.3.c**). Ainsi, l'expression de *Ddx4* et *Dazl* permet la différenciation des cellules germinales en adéquation avec le sexe de l'individu.

Les CGP interagissent également avec les cellules somatiques de la gonade pour le bon déroulement de la différenciation sexuelle. En fonction du sexe génétique et de l'environnement somatique, la différenciation des cellules germinales s'oriente vers un côté femelle ou vers un côté mâle. Chez la souris XX, les ovogonies entrent en méiose dès l'arrêt des divisions mitotiques (à 13.5 *jpc* chez la souris). Chez les mâles, les cellules germinales appelées spermatogonies arrêtent leurs divisions mitotiques et entrent en quiescence (**abordé dans la partie Introduction.I.B.3.c**).

B. La détermination du sexe

1. Historique

La détermination du sexe se définit à trois niveaux : le sexe génétique, le sexe gonadique et le sexe phénotypique. Chez les mammifères, la découverte du rôle important du chromosome Y dans la détermination du sexe date de la fin des années 50, suite à l'étude d'individus présentant un caryotype anormal. Les patients avec les caryotypes XXY (syndrome de Klinefelter) ou XXXY sont considérés comme des individus mâles (Jacobs and Strong, 1959) alors que ceux avec un caryotype XO (syndrome de Turner) sont phénotypiquement des femelles. C'est la présence du chromosome Y qui détermine la différenciation des gonades vers un phénotype mâle, peu importe le nombre de X. Il en a été déduit que le chromosome Y est nécessaire et suffisant pour donner un individu avec un phénotype mâle.

De plus, l'analyse de la structure du chromosome Y anormal chez des patients femelle XY ou mâle XX a montré que l'information nécessaire pour initier une différenciation testiculaire se situe sur le bras court du chromosome Y (Jacobs and Ross, 1966). Les chercheurs émettent alors l'hypothèse selon laquelle le chromosome Y porterait le *Testis Determining Factor* (TDF) chez l'homme et *Testis Determining Y-gene* (TDY) chez la souris. La construction d'une carte de délétion du chromosome Y, à partir de patients atteints de dysgénésie gonadique (femelle XY), a permis de localiser le TDF dans la partie télomérique du bras court du chromosome Y (Vergnaud *et al.*, 1986). Le gène SRY (*Sex-determining region of Y chromosome*) est identifié comme étant le TDF chez l'homme (Sinclair *et al.*, 1990) et le TDY chez la souris (Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990). C'est durant la période de la détermination sexuelle que s'exprime le gène SRY dans les cellules somatiques des crêtes génitales masculines pour orchestrer la mise en place du sexe gonadique. La structure, la conservation et le rôle de SRY seront décrites dans la **partie Introduction.I.B.3.a**.

Le sexe gonadique correspond à la différenciation des gonades bipotentiels en ovaire ou en testicule. C'est l'expression du gène SRY qui oriente la cascade génétique vers la voie de différenciation mâle. Les premiers événements morphologiques ayant lieu dans les gonades mâles sont la mise en place des cordons séminifères à partir de 12,5 jpc chez la souris. Chez la femelle, ce sont l'entrée en méiose des cellules germinales (chez les rongeurs) ou la mise en place des cordons ovigères (chez les ruminants et l'homme) qui représentent les premiers indices morphologiques de la différenciation gonadique chez un fœtus femelle XX qui apparaissent à partir de 13,5 jpc chez la souris.

Du sexe gonadique découle le sexe phénotypique. Il correspond à la différenciation du tractus génital (interne et externe) pendant la vie embryonnaire et à l'acquisition des caractères sexuels secondaires lors de la puberté (par exemple, le développement des seins chez la femme ou la pilosité faciale et le développement musculaire plus important chez l'homme). La mise en place du sexe phénotypique XY dépend de la présence ou de l'absence d'hormones testiculaires qui sont la testostérone et l'AMH (*anti-müllerian hormone*). Dans les années 1950, les travaux d'Alfred Jost ont démontré que la différenciation de l'appareil génital de type mâle nécessite la production des hormones testiculaires. Par contre, l'ablation des gonades d'un individu XX ou XY entraîne une différenciation génitale interne et externe de type femelle uniquement (Jost, 1950). De ces observations résulte le dogme que le sexe femelle est le sexe « constitutif » qui se développe « par défaut » alors que le sexe mâle se met en place par un processus actif nécessitant la présence de testicules. La découverte du gène SRY nécessaire et suffisant pour induire une différenciation des gonades embryonnaires en testicules a renforcé ce dogme.

Ce n'est qu'à la fin du 20^{ème}, début du 21^{ème} siècle que les premières hypothèses d'une différenciation active de la gonade indifférenciée en ovaire apparaissent. Au début des années 1990,

l'étude d'homme XX sans translocation de SRY a emmené à poser l'hypothèse qu'un gène ovarien, alors nommé Z, porte une mutation récessive chez ces individus. Le gène Z en condition normale serait impliqué dans la répression de la cascade génétique mâle (McElreavey *et al.*, 1993). Quelques temps après, au laboratoire, un phénotype semblable a été mis en évidence chez les chèvres PIS (pour *Polled Intersex Syndrome*). Ces animaux, porteurs d'une mutation naturelle, sont des mâles XX sans aucune présence de chromosome Y (donc sans SRY) (Pailhoux *et al.*, 2001). Le gène Z entrainerait la répression des gènes spécifiques de la différenciation testiculaire chez les individus XX. Ainsi en absence du gène Z chez les individus XX, les gènes spécifiques de la voie mâle s'expriment et entraînent un développement de testicules. A l'inverse, chez les individus XY, SRY réprime le gène Z dans les gonades pour permettre l'expression des gènes spécifiques du développement testiculaire (McElreavey *et al.*, 1993). Plus tard, des études *in vitro* à partir de cellules humaines et murines ont mis en évidence une régulation négative de SRY sur la signalisation WNT/ β -caténine (Bernard *et al.*, 2008; Tamashiro *et al.*, 2008). Enfin, des inversions sexuelles complètes d'individus XX ont été observées dans des familles consanguines présentant des mutations pour les gènes *Rspo1* (pour Rspodin 1) et *Wnt4* (pour *Wingless-type MMTV integration site family, member 4*), tous deux impliqués dans la voie WNT/ β -caténine (Mandel *et al.*, 2008; Parma *et al.*, 2006). A l'inverse, une inversion sexuelle de type mâle vers femelle a été observé chez un patient XY avec une duplication de la région chromosomique comportant les gènes de *Rspo1* et *Wnt4* (Jordan *et al.*, 2001). Ces observations mettent en lumière le rôle de RSPO1 et WNT4 dans la détermination du sexe femelle chez l'Homme. Chez la souris, l'expression de *Rspo1* et *Wnt4* débutent respectivement à 10,5 et 11 *jpc* dans les gonades indifférenciées des deux sexes, puis deviennent spécifiques de l'ovaire dès 12,5 et 11,5 *jpc* respectivement (Chassot *et al.*, 2008; Vainio *et al.*, 1999).

En parallèle, une autre voie indispensable à la différenciation de l'ovaire est celle de FOXL2 (pour forkhead box L2), indépendante de la voie WNT/ β -caténine (Chassot *et al.*, 2008). En 2014, au laboratoire, la perte de fonction du seul gène codant pour *Foxl2* a été réalisée dans des embryons de chèvre et entraîne une inversion sexuelle de type mâle XX. Ceci démontre ainsi le rôle de *Foxl2* comme déterminant du sexe femelle chez la chèvre (Boulangier *et al.*, 2014). RSPO1, WNT4 et FOXL2 sont donc les gènes de la voie de différenciation femelle. Ces gènes s'opposent à la voie de différenciation masculine (Pannetier and Pailhoux, 2010; Uhlenhaut *et al.*, 2009).

Chez la souris, l'expression de *Foxl2* commence dès 11.5 *jpc* dans les précurseurs des cellules de la granulosa de l'ovaire. L'inactivation de *Foxl2* dans cette espèce entraîne une insuffisance ovarienne prématurée observable après la naissance (Schmidt *et al.*, 2004; Uda *et al.*, 2004). Ainsi *Foxl2* est essentiel pour préserver le stock folliculaire ovarien après la naissance. Il apparaît également que *Foxl2* est essentiel pour le maintien de l'identité ovarienne : l'ablation de *Foxl2* dans l'ovaire adulte entraîne une transdifférenciation des cellules de la granulosa en cellules de type Sertoli (Uhlenhaut *et al.*, 2009).

Ainsi, à partir des gonades « bipotentielles », le sexe génétique influence le devenir de ces gonades vers une différenciation ovarienne ou testiculaire (sexe gonadique). Cette différenciation a un rôle primordial dans la mise en place du sexe phénotypique permettant ainsi la mise en place correcte des fonctions de reproduction. Des régulations génétiques et hormonales sont nécessaires pour le bon déroulement de toutes ces étapes.

2. Détermination sexuelle : Rôle de SRY

La différenciation du testicule murin est histologiquement visible dès 12,5 *jpc* soit plus précocement que celle de l'ovaire. L'expression du gène SRY dans la gonade mâle déclenche une cascade génique. Cette cascade est à l'origine de la différenciation des gonades XY en testicules.

Sry est un gène mono-exonique de 1188 paires de bases (pb) chez la souris codant pour une protéine de 395 acides aminés. Chez l'homme le transcrit fait 845 pb codant pour une protéine de 204 acides aminés. Cette protéine est composée d'un domaine N-terminal, C-terminal ainsi qu'un domaine HMG (High Mobility Group). La souris possède un domaine riche en glutamine spécifique à cette espèce. Seul le domaine HMG de SRY est très conservé entre les espèces de mammifères. Cette région fonctionne comme un motif de liaison et de flexion de l'ADN et reconnaît avec une forte affinité le motif A/TAACAAT/A (Harley *et al.*, 2003; Whitfield *et al.*, 1993). La séquence centrale AACAAT est reconnue par la famille de protéines SOX (pour SRY type HMG box) mais avec une affinité plus faible que SRY. Ce domaine HMG contient également deux motifs de localisation nucléaire ainsi qu'un motif d'export nucléaire. Ce domaine présente un rôle important pour la fonction de SRY puisque les patients présentant des mutations au niveau du domaine HMG de SRY présentent une dysgénésie gonadique pour 20% des cas de femmes XY (Poulat *et al.*, 1994). Ainsi, une mutation du domaine HMG empêche l'action de la protéine SRY.

Sry est exprimé à partir de 10,5 *jpc* chez la souris et 41 jours de vie embryonnaire chez l'homme dans les précurseurs des cellules de soutien (pré-Sertoli) des gonades XY dites indifférenciées (Bradford *et al.*, 2009; Hanley *et al.*, 2000). Les facteurs de transcription SF1/WT1 (Achermann *et al.*, 2002; Bradford *et al.*, 2009) ainsi que GATA4/FOG2 (Friend Of GATA Protein 2) (Tevosian *et al.*, 2002), présents dans les crêtes génitales, initient l'expression de *Sry*. Son expression augmente jusqu'à 11,5 *jpc* chez la souris puis diminue et n'est plus détectable à 12,5 *jpc* (Hacker *et al.*, 1995). Chez l'homme, l'expression de SRY atteint son pic à 44 jours de vie embryonnaire avant de diminuer. Contrairement à la souris, l'expression testiculaire de SRY chez l'homme reste faible (mais détectable) jusqu'à l'âge adulte (Hanley *et al.*, 2000). Chez le bouc, l'expression de SRY (détecté à partir de 36 *jpc* lors de la différenciation primaire du testicule) est retrouvée dans la plupart des cellules des crêtes génitales

(cellules germinales et cellules pré-Sertoli), ce qui est également différent par rapport à son expression chez la souris. Chez le bouc adulte, SRY est fortement exprimé dans les cellules de Sertoli et a disparu des autres lignées cellulaires du testicule (Montazer-Torbati *et al.*, 2010).

Chez la souris, les travaux de Schmahl *et al.* (2000), ont mis en évidence que le premier événement induit par l'expression de *Sry* est l'augmentation de la taille des gonades XY. C'est la prolifération des cellules pré-Sertoli (SF1 positives) dès 11,25 *jpc* qui entraîne une augmentation de la taille des gonades XY jusqu'à environ 12,5 *jpc* (Karl and Capel, 1998; Schmahl *et al.*, 2000).

De nombreux gènes sont exprimés en aval de l'expression de SRY tel que *Sox9* (SRY-box transcription factor 9), *Fgf9* (fibroblast growth factor 9), *Dhh* (Desert Hedgehog). Chez la souris, l'expression de SRY entraîne l'expression de SOX9 dans les mêmes cellules de Sertoli. Puis l'expression de SRY diminue et les cellules sont positives uniquement pour SOX9 (Sekido *et al.*, 2004). Par contre, l'expression de SOX9 diminue en absence de SRY (Sekido *et al.*, 2004). Ainsi, SRY est essentielle pour la régulation positive de l'expression de *Sox9* qui s'exprime alors fortement dans les cellules de Sertoli : SRY se localise dans le noyau des cellules et agit comme un activateur transcriptionnel de *Sox9* (Klower *et al.*, 2011).

Comme évoqué précédemment, SRY joue également un rôle de répresseur des gènes de la voie femelle en inhibant la voie WNT/ β -caténine. Ainsi SRY inhibe la signalisation Wnt dans la voie de différenciation mâle.

3. La différenciation testiculaire

a. La cascade génique en aval de SRY

i. Activation de l'expression de *Sox9*

Sox9 est un gène autosomal très bien conservé chez les vertébrés, faisant partie des gènes de la famille SOX. Il possède une HMG box avec un signal de localisation nucléaire et d'export nucléaire. La perte de fonction du gène *Sox9* entraîne une inversion du sexe de type femelle XY chez la souris (similaire à la perte de fonction *Sry*) accompagné d'une létalité périnatale (Barrionuevo *et al.*, 2006; Chaboissier *et al.*, 2004). A l'inverse, le gain de fonction de *Sox9*, chez des souris mutantes *OdSex* (*Ods*) XX, entraîne une inversion du sexe de type mâle XX (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001). Chez l'homme, des mutations hétérozygotes de *Sox9* chez des individus XY entraîne une dysplasie campomélique (malformation squelettique) associée dans la majorité des cas à une inversion du sexe (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Les travaux de Huang *et al.*, ont également recensé un individu XX présentant une inversion sexuelle de type mâle XX dû à la duplication d'une partie chromosomique contenant le gène *SOX9* (Huang *et al.*, 1999). Ceci suggère que la souris est moins sensible au dosage de *Sox9* que l'Homme. Les cas de duplication de *SOX9* chez les individus XX

montrent que *SOX9* est suffisant en absence de *Sry* pour induire la différenciation et le développement des testicules.

Au préalable à l'expression de *Sry*, il a été montré que *SOX9* est exprimé en très faible quantité (transcrit et protéine) à 10,5 *jpc* chez la souris dans le cytoplasme des cellules de soutien des gonades des deux sexes (Sekido *et al.*, 2004). C'est SF1 qui initie cette faible expression de *Sox9* en se liant à la région régulatrice appelée TESCO (pour *Testis-specific Enhancer of Sox9 Core Region*) située en amont de *Sox9* (Sekido and Lovell-Badge, 2008) (**Figure 5A**). Chez la souris, l'élément central TESCO de 1,4 kb est situé dans une région amplificatrice spécifique du testicule de 3,2kb appelé TES (pour *Testis specific Enhancer of Sox9*) localisée en amont du gène *Sox9*. Ainsi, dans un premier temps, l'expression de *Sox9* n'est pas dépendante de SRY mais de la liaison de SF1 à la région TESCO. Lorsque *Sry* est exprimé dans les gonades XY, à partir de 10,5 *jpc*, la protéine SRY est alors transloquée dans le noyau et coopère avec SF1 pour se lier au niveau de TESCO (Sekido and Lovell-Badge, 2008) : cette coopération entraîne la régulation positive de l'expression de *Sox9* dans les gonades mâles dès 11 *jpc* (**Figure 5B**). Chez la femelle, l'expression de *Sox9* disparaît puisqu'il n'y a pas d'expression de SRY. A 12,5 *jpc*, SRY n'est plus exprimé dans le testicule murin alors que *Sox9* maintient son expression. Aussi, *SOX9* vient remplacer SRY au niveau de TESCO pour maintenir sa propre expression (Sekido and Lovell-Badge, 2008) (**Figure 5C**). D'autres boucles de régulations positives de *Sox9* se mettent en place et permettent le maintien de l'expression de *Sox9* en absence de SRY.

Cet élément TESCO a été décrit comme la région essentielle pour permettre l'expression de *SOX9* dans le testicule (Sekido and Lovell-Badge, 2008). Plus récemment, les travaux du laboratoire de R. Lovell-Badge ont montré qu'une délétion (par la technologie CRISPR/Cas9) de la région TES ou de l'élément TESCO chez la souris entraîne une réduction de l'expression de *Sox9* uniquement de 45% à 60% dans ces gonades fœtales XY mutantes par rapport aux gonades WT, sans inversion du sexe (Gonen *et al.*, 2017). Ces résultats confirment l'importance de la zone régulatrice TES/TESCO en tant qu'enhancer pour l'expression de *Sox9*, mais ils mettent en évidence l'implication de facteur(s) supplémentaire(s) pour la détermination du sexe mâle. En 2018, c'est à nouveau l'équipe de Lovell-Badge qui met en évidence une séquence de 557 pb, nommée *Enh13* (pour *Enhancer 13*). Cette séquence est hautement conservée chez les mammifères, avec des séquences consensus de sites de liaison à *Sry* et *Sox9*. La suppression de *Enh13* chez la souris XY entraîne une inversion du sexe de type femelle XY : l'expression de *Sox9* à 11,5 *jpc* chez les mutants XY *Enh13*^{-/-} est comparable à celle de femelles WT (Gonen *et al.*, 2018). L'absence de *Enh13* entraîne également une diminution de l'expression de *Sox9* chez les souris XX à 11,5 *jpc*. Ainsi, *Enh13* joue un rôle (i) dans l'expression de *Sox9* indépendante de SRY dans les deux sexes puis (ii) dans l'augmentation initiale de l'expression de *Sox9* dépendante de SRY et enfin (iii) la maintenance de *Sox9* (Gonen *et al.*, 2018). *Enh13* pourrait jouer le

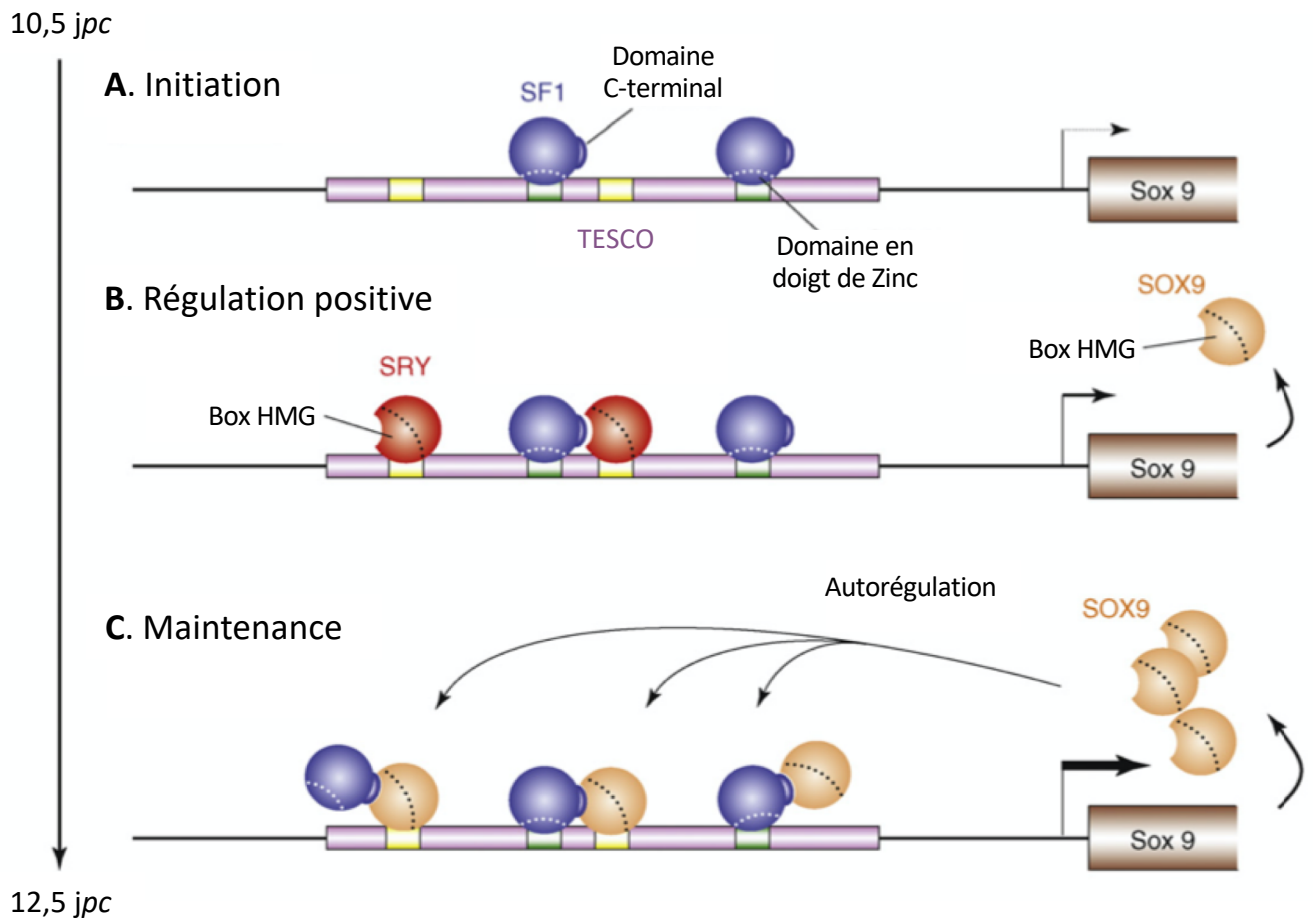


Figure 5 : Modèle de régulation de l'expression de *Sox9* dans les gonades XY.

La régulation de *Sox9* durant le développement embryonnaire est divisée en trois étapes : l'initiation, la régulation positive et la maintenance de l'expression de *Sox9*. **(A)** L'initiation de l'expression de *Sox9* dans les gonades dès 10,5 jpc dépend de SF1 qui se fixe sur les régions régulatrices de *Sox9* pour promouvoir son expression à "bas bruit". **(B)** La régulation positive de l'expression de *Sox9* dans les gonades XY est due à la présence de SRY. Celui-ci se fixe au site TESCO seul ou en coopération avec SF1 permettant une augmentation de la transcription de *Sox9*. **(C)** Lorsque SRY n'est plus exprimé dans la gonade, SOX9 maintient son expression en se fixant à ces éléments TESCO et exerce ainsi une boucle de régulation positive autonome.

D'après Sekido et Lovell-Badge, 2009.

même rôle chez l'homme vu sa localisation au niveau de la région « XY SR » (pour XY sex reversal region) connue pour entraîner des inversions sexuelles (Gonen *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2015a).

ii. Boucle d'autorégulation de l'expression Sox9

Suite à la régulation positive de *Sox9* initié par SRY, plusieurs systèmes se mettent en place pour maintenir l'expression de SOX9 en absence de SRY. Lorsque SOX9 atteint un certain seuil d'expression, il y a une régulation autonome par fixation de SOX9 à la place de SRY sur ses sites enhancers, créant ainsi une boucle d'autorégulation positive. Ces sites enhancers sont présents au niveau de la région TES mais également au niveau de *Enh13* (Gonen *et al.*, 2018).

Une deuxième boucle d'amplification fait intervenir FGF9/FGFR2. Dans un premier temps, c'est l'expression de *Sox9* qui est nécessaire pour l'expression de *Fgf9*. Puis *Fgf9* est essentiel dès 11,5 *jpc* pour le maintien de l'expression de *Sox9* dans les cellules de Sertoli (Kim *et al.*, 2006). FGF9 induit également la localisation nucléaire de son récepteur FGFR2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2) qui stimule l'expression de *Fgf9* (Schmahl *et al.*, 2004). De plus, FGF9/FGFR2 participent à la prolifération des précurseurs des cellules de Sertoli (Schmahl *et al.*, 2004). L'invalidation de *Fgf9* chez la souris induit une réversion du sexe de type femelle XY (Colvin *et al.*, 2001) alors que l'invalidation conditionnelle de *Fgfr2* entraîne le développement d'ovo-testicules (Bagheri-Fam *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007). Ainsi, la boucle d'amplification de SOX9 avec FGF9/FGFR2 est essentielle pour la poursuite de la différenciation testiculaire.

La signalisation PTGDS/PGD₂ est également impliquée dans une boucle de régulation de SOX9. Cette boucle de régulation agit indépendamment de FGF9/FGFR2 (Bagheri-Fam *et al.*, 2008; Moniot *et al.*, 2009). SOX9 active le promoteur du gène *Ptgds* (pour *Prostaglandine D synthase*) spécifique du testicule : son expression est alors détectée dans les cellules pré-Sertoli et les spermatogonies à partir de 11,5 *jpc* chez la souris (Adams and McLaren, 2002; Moniot *et al.*, 2009). L'activité enzymatique de *Ptgds* permet la production de Prostaglandine D₂ (PGD₂) qui agit comme un signal paracrine pour la différenciation des cellules de Sertoli. En effet, l'invalidation de l'enzyme *Ptgds* dans les gonades XY entraîne un défaut du développement des testicules avec un retard de différenciation des cellules de Sertoli jusqu'à 13,5 *jpc*. Ces anomalies sont accompagnées d'une diminution de 50% de l'expression de *Sox9* dans les testicules et un retard de la translocation nucléaire de SOX9 (Moniot *et al.*, 2009). A l'inverse, l'ajout de PGD₂ exogène dans le milieu de culture de gonades XX entraîne différents degrés de masculinisation des crêtes génitales avec une expression de l'AMH (marqueur des cellules de Sertoli) (Adams and McLaren, 2002). Ainsi, la signalisation PTGDS/PGD₂ participe à la différenciation des cellules de Sertoli en assurant un niveau d'expression de *Sox9* suffisant dans ces cellules. La PGD₂ sécrétée agit via son récepteur membranaire spécifique qui stimule la production d'AMPC (Adénosine Mono-Phosphate cyclique). Puis, l'AMPC active la PKA (pour Protéine Kinase A) qui phosphoryle SOX9.

La phosphorylation de SOX9 favorise son interaction avec l'importine- β et permet ainsi sa translocation dans le noyau des cellules pré-Sertoli. Une fois dans le noyau, SOX9 régule de façon positive sa propre expression (Malki *et al.*, 2005; Moniot *et al.*, 2009).

Les deux boucles de régulation FGF9/FGFR2 et PTGDS/PGD2 fonctionnent en parallèle. Elles assurent la différenciation d'un nombre suffisant de cellules de Sertoli pour permettre le maintien du taux de SOX9 et ainsi entrainer l'initiation de la différenciation du testicule (**Figure 6**).

iii. Les gènes cibles de SOX9 :

Rapidement après son expression, SOX9 permet une régulation positive de l'AMH. Cette hormone entraine notamment la régression des canaux de Müller vers 14,5 *jpc* chez les souris mâles. Le promoteur de l'AMH possède des sites de fixation aux protéines SF1 et SOX9 : en collaboration avec SF1, SOX9 se fixe sur le promoteur proximal de l'*Amh* et permet son expression par les cellules de Sertoli fœtale dès 11,5 *jpc* (De Santa Barbara *et al.*, 1998; Giuili *et al.*, 1997). L'absence d'AMH suite à une délétion génique entraine la formation normale du testicule mais les souris sont infertiles. Les mâles présentent toujours des canaux de Muller qui n'ont pas régressés empêchant la descente testiculaire (cryptorchidie) ce qui entraine une absence de production de spermatozoïdes (Behringer *et al.*, 1994). L'expression de l'*Amh* est également régulée par d'autres facteurs comme GATA4, WT1 ou encore DAX1 (voir Oréal *et al.*, 2002; Salmon *et al.*, 2005).

SOX9 avec SF1 régulent *Dhh* qui est exprimé par les cellules de Sertoli dès 11,5 *jpc* (Li *et al.*, 2014). Son récepteur, Patched 1 (Ptch1), est situé sur les cellules de Leydig et les cellules myoïdes périvitubulaires dès 11,5 *jpc* (Yao *et al.*, 2002). Une lignée de souris *Dhh*^{-/-} présente une désorganisation de la structure des tubes séminifères avec une lame basale discontinue ainsi qu'un défaut de différenciation des cellules périvitubulaires myoïdes et des cellules de Leydig (Clark *et al.*, 2000; Pierucci-Alves *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2002). Ainsi, l'expression de *Dhh* est essentielle pour la structure des tubes séminifères et de l'espace interstitiel.

Toujours en collaboration avec SF1, SOX9 régule positivement l'expression de *Cyp26b1* (Cytochrome P450, family 26, subfamily B, member 1) à partir de 11,5 *jpc* dans les cellules interstitielles et pré-Sertoli des testicules embryonnaires murins (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006). Cette enzyme empêche l'action de l'acide rétinoïque pour inhiber l'initiation de la méiose des cellules germinales dans le testicule embryonnaire (**voir Introduction.I.B.3.c**). Des lignées mutées pour *Sf1* ou *Sox9* (mutation conditionnelle sous le contrôle du promoteur de l'AMH appelé SOX9^{Δ/Δ}) présentent respectivement une diminution de l'expression de *Cyp26b1* à partir de 12,5 et 13,5 *jpc* dans le testicule fœtal murin. A l'inverse, l'ajout *in vitro* de vecteur d'expression de SOX9 et SF1 augmente l'expression de *Cyp26b1* dans les cellules TM3 (Kashimada *et al.*, 2011). Ainsi, SOX9 en collaboration

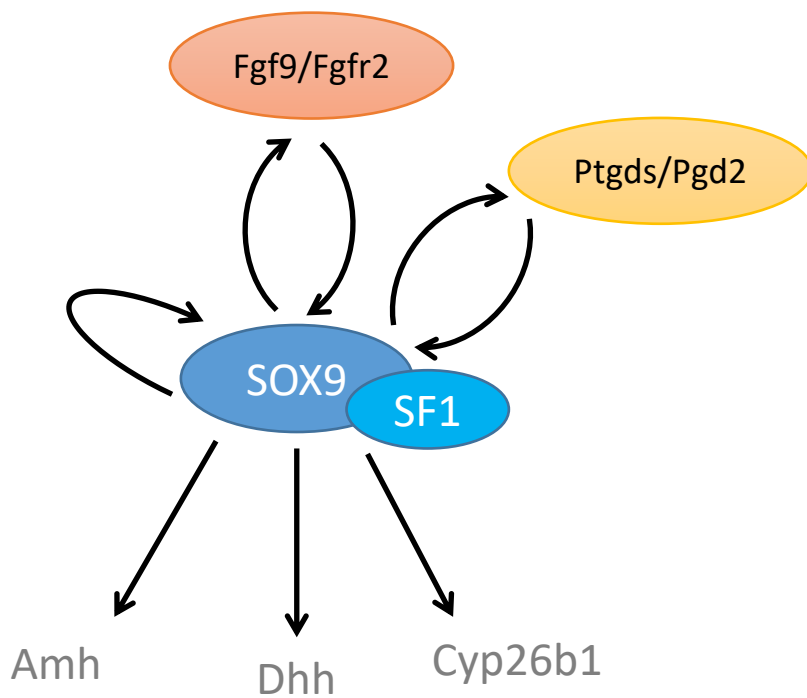


Figure 6 : Les gènes cibles de SOX9.

Quand SRY n'est plus exprimé, Sox9 maintient son expression par autorégulation positive ou encore avec deux boucles de régulation positive, Fgf9/Fgfr2 et Ptgs/Pgd2. SOX9 régule positivement l'expression de l'*Amh*, *Dhh* ainsi que *Cyp26b1*. Ces gènes sont indispensables pour la différenciation et le développement ultérieur du testicule.

avec SF1 régule positivement l'expression de *Cyp26b1* pour empêcher l'initiation de la méiose dans le testicule foetal et maintenir les cellules germinales mâle en quiescence.

D'autres gènes ont un rôle dans la cascade génique en aval de SOX9. Ils assurent le maintien de l'identité du testicule différencié.

Une étude de délétion conditionnelle des souris *Sox9^{Δ/Δ}* dépendantes de l'AMH a mis en évidence que *Sox9* n'est pas essentiel pour le développement des testicules après 14,5 *jpc* (Barrionuevo *et al.*, 2009). Ces observations laissent supposer que des protéines avec un rôle redondant à celui de SOX9 seraient présentes dans les gonades XY. Le transcrite *Sox8* est détecté dans les cellules de Sertoli à partir de 12 *jpc* chez la souris soit après l'expression de *Sox9* (Schepers *et al.*, 2003). SOX8 possède les mêmes caractéristiques structurales que SOX9, ce qui lui permet d'activer les mêmes cibles (le promoteur de *Amh* en synergie avec SF1 (Schepers *et al.*, 2003)). Aucune anomalie du développement testiculaire n'est observée chez les souris mutées pour *Sox8*. C'est seulement à l'âge adulte que les souris *Sox8^{-/-}* présentent des défauts de la spermatogenèse et une infertilité qui apparaît vers 5 mois (O'Bryan *et al.*, 2008). Un phénotype similaire est observé chez des souris *Sox9^{Δ/Δ}* traduisant une redondance fonctionnelle entre *Sox8* et *Sox9* (Barrionuevo *et al.*, 2009). Chez les doubles mutants (*Sox9* et *Sox8*), un phénotype plus drastique est observé lorsque *Sox8* est muté à l'état hétérozygote avec une désorganisation des cordons séminifères dès 12 *jpp* (Barrionuevo *et al.*, 2009). Ainsi, *Sox8* joue un rôle dans le maintien de la fonction testiculaire et peut compenser, à un certain stade de développement, la perte de *Sox9*. En 2016, Barrionuevo *et al.* ont mis en évidence que *Sox9* et *Sox8* garantissent l'intégrité du testicule adulte en coordination avec *Dmrt1* (Barrionuevo *et al.*, 2016).

Dmrt1 (Double sex and mab-3 related transcription factor 1) est un régulateur transcriptionnel très conservé chez les vertébrés. Il contient deux domaines de liaison à l'ADN en doigt de zinc appelés domaine DM. Ses orthologues *Dsx* (Doublesex) et *MNonAB-3* (Male abnormal-3) sont décrits comme les gènes de la détermination sexuelle dans plusieurs espèces d'arthropodes et de nématodes respectivement (Raymond *et al.*, 1998).

Chez la souris, *Dmrt1* est exprimé à partir de 10,5 *jpc* de façon similaire dans les crêtes génitales des deux sexes. Durant la période de la détermination testiculaire (12,5 *jpc*), l'expression de *Dmrt1* est différente en fonction du sexe gonadique. Dans les cordons testiculaires, *Dmrt1* est plus fortement exprimé dans les cellules somatiques que dans les cellules germinales. L'inverse est observé chez la femelle avec une expression de *Dmrt1* plus importante dans les cellules germinales par rapport aux cellules somatiques (Lei *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 1999). A partir de 13,5 *jpc*, donc après la détermination sexuelle, *Dmrt1* est exprimé dans les cellules somatiques seulement chez les mâles : ces cellules correspondent aux cellules de Sertoli embryonnaires (Lei *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 1999).

Par contre l'expression de *Dmrt1* dans les CGP est retrouvée dans les deux sexes avec un pic d'expression à 13,5 *jpc* puis une forte diminution de son expression à 15,5 *jpc*. Enfin, après la naissance, *Dmrt1* est détecté uniquement dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales du testicule alors qu'il n'est plus retrouvé dans l'ovaire (Lei *et al.*, 2007).

L'absence de *Dmrt1* chez la souris n'entraîne pas d'inversion du sexe durant le développement embryonnaire. C'est après la naissance que les testicules *Dmrt1*^{-/-} deviennent hypoplasiques à partir de 2 semaines. Ils présentent une désorganisation des tubes séminifères ainsi qu'une diminution du nombre de cellules germinales (Raymond *et al.*, 2000). L'étude de Matson *et al.* (2011) pose l'hypothèse qu'une invalidation de *Dmrt1* entraîne une féminisation des gonades chez la souris. En condition normale, le facteur de transcription FOXL2 est spécifiquement exprimé dans les gonades femelles. Chez des souris *Dmrt1*^{-/-}, des expériences d'immunofluorescences dans des gonades adultes ont mis en évidence une expression anormale de FOXL2 dans les testicules. Puis il a été montré que l'invalidation conditionnelle de *Dmrt1* uniquement dans les cellules de Sertoli fœtales permet une expression de *Foxl2*. En effet, la délétion de *Dmrt1* inducible par le tamoxifène entraîne une perte d'expression de *Sox9* dans les cellules de Sertoli qui expriment alors *Foxl2* (Matson *et al.*, 2011). L'expression de FOXL2 dans le testicule délété pour *Dmrt1* entraîne la surexpression des gènes spécifiques de l'ovaire tels que *Lhcgr* (pour *luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*), *Prlr* (pour *Prolactin receptor*), *Fshr* (pour *Follicle stimulating hormone receptor*), *Inha* (*inhibin alpha*) (Matson *et al.*, 2011). Ces observations témoignent d'une transdifférenciation des cellules de Sertoli *Dmrt1*^{-/-} en cellules de granulosa. Ainsi, chez la souris, *Dmrt1* n'est pas indispensable à la différenciation du sexe mâle mais permet le maintien du testicule en préservant l'identité des cellules de Sertoli adultes. Il permet de réprimer l'expression des gènes de la voie femelle (comme *Foxl2*) et de maintenir l'expression des gènes de la voie mâle (comme *Sox9*).

De plus, la surexpression de *Dmrt1* dès 10,5 *jpc* dans les gonades XX de souris entraîne une transdifférenciation des cellules de la granulosa en cellules pseudo-Sertoliennes (Lindeman *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Des cellules de Leydig fœtales sont également observées dans ces gonades embryonnaires XX. La cascade génique spécifique de la voie mâle (comportant *Sox9*, *Sox8*, *Dhh*) est régulée à la hausse alors que les gènes de la voie femelle comme *Foxl2* voient leurs expressions fortement diminuer dans les gonades XX sur-exprimant *Dmrt1* (Lindeman *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Néanmoins, en absence de *Sry* (contexte de gonade XX), *Dmrt1* n'est pas capable d'induire la formation d'un testicule fonctionnel. Ainsi, chez la souris, le rôle de *Dmrt1* se situe en aval de *Sox9* pour assurer la fonction de la gonade mâle et le maintien de l'identité testiculaire après la naissance.

Chez l'homme, des mutations entraînant une haplo-insuffisance de DMRT1 sont associées à des troubles du développement sexuel d'individu XY. Selon les mutations, ces troubles peuvent être

des dysgénésies complètes ou partielles des gonades XY ou une inversion du sexe de type femelle XY (Ledig *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2015; Veitia *et al.*, 1997). L'observation d'un phénotype plus drastique chez l'homme par rapport à la souris suggère que *Dmrt1* aurait un rôle plus précoce chez l'homme. Dans l'espèce caprine, il a été mis en évidence que *DMRT1* s'exprime en amont de *SOX9* dans les cellules somatiques, menant à l'hypothèse que *DMRT1* pourrait être un gène régulant l'expression de *SOX9* dans cette espèce (Elzaiat *et al.*, 2014). Ainsi, le rôle de *DMRT1* dans la différenciation du testicule est différent selon les espèces et dépend notamment de la place de *DMRT1* dans la cascade génique (en aval ou en amont de *SOX9*).

L'étude des sites de liaison de *SOX9* dans le testicule fœtal murin et bovin a mis en évidence un motif d'ADN génomique caractérisant les gènes liés par *SOX9* dans les cellules de Sertoli. Ce domaine génomique appelé la signature des cellules de Sertoli (SCS pour *Sertoli Cell Signature*) est conservé chez les mammifères. Cette signature regroupe de façon organisée les sites de liaison des protéines *SOX9*, *GATA4* et *DMRT1* à moins de 50 pb les uns des autres (Rahmoun *et al.*, 2017). Ces observations suggèrent que le SCS pourrait faciliter l'expression des facteurs nécessaires pour la différenciation des cellules de Sertoli en favorisant la liaison de *SOX9* sur ces gènes cibles ainsi que la fixation d'autres facteurs également impliqués dans la différenciation des cellules de Sertoli fœtales.

b. Morphogenèse du testicule embryonnaire : différenciation des cellules somatiques

La différenciation des cellules somatiques entraîne une spécialisation des cellules dans les testicules. Cette spécialisation des cellules initie des changements morphologiques nécessaires pour la croissance et les fonctions testiculaires. Les cellules somatiques mâles se différencient en 4 types cellulaires distincts : les cellules de Sertoli, les cellules endothéliales, les cellules de Leydig fœtales et les cellules myoïdes péritubulaires (**Figure 7**). Chez la souris, l'étude par Single Cell RNAseq du transcriptome des cellules SF1-GFP+ au cours du développement (de 10,5 à 16,5 *jpc*) a permis de mettre en évidence une seule lignée de cellules progénitrices multipotentes dans les gonades bipotentiels à l'origine des cellules de soutien et des cellules stéroïdogènes (Stévant *et al.*, 2018, 2019). Ces cellules progénitrices présentent une évolution progressive dans le temps de leurs transcriptomes à l'origine de la différenciation vers les lignées cellulaires de soutien et stéroïdogènes (Stévant *et al.*, 2018, 2019).

i. Différenciation des cellules de Sertoli

La cascade génique spécifique chez le mâle orchestre la différenciation du testicule à partir des gonades indifférenciées. Comme détaillé précédemment, la transcription de *Sry*, dès 10,5 *jpc* chez la souris, dans les cellules de l'épithélium cœlomique, régule positivement l'expression de *SOX9* dans ces

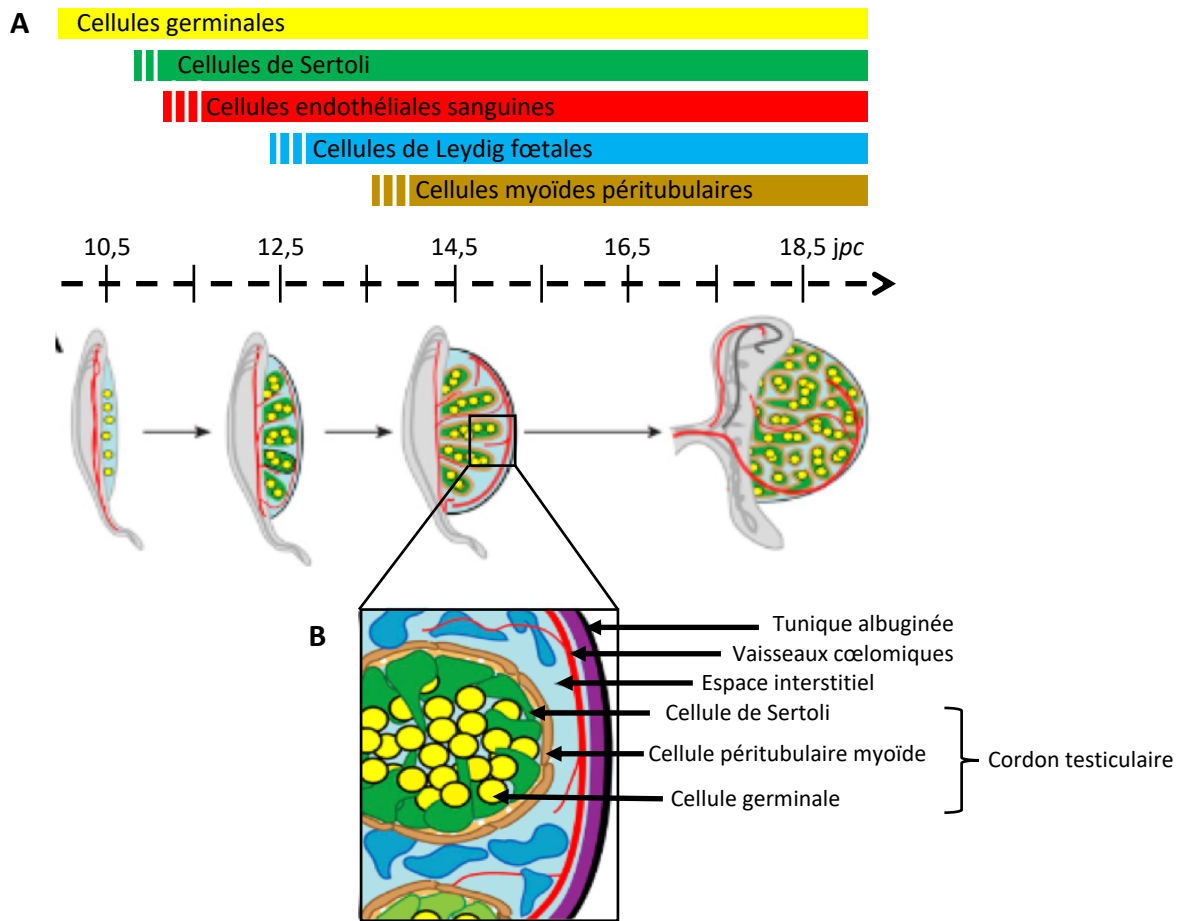


Figure 7 : Morphogenèse du testicule embryonnaire.

(A) Chronologie de la différenciation des différentes lignées cellulaires durant la morphogenèse du testicule embryonnaire. Les cellules germinales envahissent la gonade à partir de 10,5 *jpc*. Puis, les cellules de Leydig sont les premières cellules somatiques qui se différencient. Les cellules endothéliales migrent dès 11,5 *jpc* dans le testicule et participent à la formation des cordons séminifères. A 12,5 *jpc*, les cellules de Leydig se différencient et enfin les cellules myoïdes périvitubulaires à 13,5 *jpc*. (B) Organisation cellulaire du testicule fœtale à 14,5 *jpc*.

D'après Svngen et Koopman, 2013.

cellules alors appelés cellules pré-Sertoli. *Sox9* doit être exprimé dans les cellules de pré-Sertoli pour assurer la différenciation d'un nombre suffisant de cellules de Sertoli. Pour cela, les cellules de pré-Sertoli prolifèrent pendant leur migration dans la gonade (entre 10,5 et 11,5 *jpc*) ce qui augmente le nombre de cellules SOX9 positives (Schmahl *et al.*, 2000; Schmahl & Capel, 2003). Les boucles de régulation FGF9/FGFR2 et PTGDS/PGD2 amplifient l'expression de SOX9 permettant son expression dans des cellules SRY négatives (**voir la partie Introduction.I.B.3.a.ii**). Les cellules de Sertoli sont les premières cellules somatiques à se différencier dans le testicule embryonnaire. Elles ont un rôle central dans la différenciation du testicule puisqu'elles orchestrent la différenciation des autres types cellulaires de la gonade et sont indispensables à la formation des cordons testiculaires (**Figure 7A**).

A partir de 12 *jpc* chez la souris, les cellules de Sertoli différenciées forment des interactions cellulaires les unes avec les autres puis s'agrègent autour des clusters des cellules germinales : elles créent des contacts avec ces cellules germinales pour former les premiers cordons testiculaires (futurs cordons séminifères) (Nel-Themaat *et al.*, 2009) (**Figure 7B**). La formation des cordons testiculaires n'est pas dépendante des cellules germinales, puisque des cordons parviennent à se former en culture *in vitro* à partir de cellules somatiques XY sans cellules germinales (Escalante-Alcalde and Merchant-Larios, 1992) et *in vivo* (McCoshen, 1983).

Après 13,5 *jpc*, une fois que la croissance et la mise en place des cordons testiculaires sont terminées, les cellules de Sertoli opèrent une transition en cellule de type épithéliale, migrent vers la périphérie des cordons et se polarisent (Nel-Themaat *et al.*, 2011).

ii. Différenciation des cellules endothéliales vasculaires

Les cellules endothéliales vasculaires jouent un rôle important dans la formation des cordons testiculaires. Ces cellules, issues du mésonephros, migrent dans la gonade vers 11,5 *jpc* (Coveney *et al.*, 2008). L'inhibition de la migration des cellules endothéliales vasculaires perturbe la formation des cordons testiculaires (Combes *et al.*, 2009). En effet, une fois dans la gonade, les cellules endothéliales forment le vaisseau cœlomique (futurs vaisseaux sanguins) du testicule ce qui permet la fragmentation des clusters pour former les cordons séminifères. Ce sont les facteurs sécrétés dans la gonade par les cellules de Sertoli tels que VEGF (Cool *et al.*, 2011) et l'inhibine β B (*Inhbb*) (Yao *et al.*, 2006) qui initient la migration des cellules endothéliales vasculaires dans le testicule. Dans l'ovaire, *Inhbb* est réprimé par WNT4 et la Follistatine (Liu *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2006).

iii. Différenciation des cellules de Leydig fœtales

Une fonction essentielle du testicule est la production d'androgènes dans le milieu interstitiel (entre les cordons testiculaires). Ce sont les cellules de Leydig qui assurent cette fonction. Elles sont

divisées en deux populations distinctes : les cellules de Leydig fœtales et les cellules de Leydig adultes qui se différencient respectivement dans le testicule embryonnaire et post-natal. La différenciation des cellules de Leydig adulte sera abordée dans la partie **Introduction II.A.2**.

L'absence de marqueur des cellules de Leydig fœtales a été un frein pour l'identification des précurseurs de ces cellules et reste un sujet controversé. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que les cellules fœtales avaient pour origine le mésonéphros (Merchant-Larios and Moreno-Mendoza, 1998; Nishino *et al.*, 2001). Néanmoins, des cellules progénitrices des cellules de Leydig sont présentes dans l'espace interstitiel dès 11,5 *jpc* (Merchant-Larios *et al.*, 1993) suggérant que ces précurseurs ne sont pas issus du mésonéphros. Les travaux de DeFalco *et al.* (2011) ont identifié 3 nouveaux marqueurs des cellules interstitielles : les facteurs de transcriptions MAF (pour *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B*), MAFB et C-MAF, et la molécule de surface VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*). Exprimés entre 11,5 et 13,5 *jpc* chez la souris, ces marqueurs ont permis de mettre en évidence les deux populations progénitrices des cellules de Leydig fœtales : l'épithélium cœlomique et les cellules vasculaires associées au niveau de la frontière mésonéphros-gonade (DeFalco *et al.*, 2011). Les cellules de Leydig fœtales se différencient dès 13 *jpc* chez la souris à partir de ces cellules progénitrices, soit 24 heures après la différenciation des cellules de Sertoli. La différenciation de ces cellules fait intervenir plusieurs facteurs dépendant des cellules de Sertoli (PDGF α et DHH) et des cellules de Leydig (SF1 et ARX (pour *X-linked aristaless-related homeobox gene*)).

Les cellules de Sertoli jouent un rôle important dans la différenciation des cellules de Leydig fœtales : les facteurs DHH et PDGF α produits par les cellules de Sertoli, respectivement dès 11,5 et 12,5 *jpc*, se fixent sur leurs récepteurs respectifs PTCH1 (*Patch1*) et PDGFR α (pour *platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide*) présents sur les précurseurs des cellules de Leydig fœtales (Brennan *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2002). L'étude des lignées de souris dépourvues de *Dhh* et *Pdgfr- α* montrent que ces animaux possèdent peu ou pas de cellules de Leydig fœtales dans les gonades XY (Brennan *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2002). A l'inverse, le développement des gonades XX n'est pas affecté en absence de *Pdgfr- α* et de *Dhh*. Dans ces études, les auteurs ont mis en évidence que les cellules de Leydig fœtales ne sont pas différenciées dans les gonades *Dhh*^{-/-} et *Pdgfr- α* ^{-/-} (Brennan *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2002). Ainsi la sécrétion des facteurs DHH et PDGF α par les cellules de Sertoli est essentielle pour la différenciation des cellules de Leydig fœtales.

Le facteur SF1 est essentiel pour la différenciation des tissus stéroïdogènes comprenant les cellules de Leydig et les cellules de la glande surrénale (Luo *et al.*, 1994). Observé dans l'épithélium cœlomique en prolifération, *Sf1* est exprimé dans les précurseurs des cellules de Sertoli et de Leydig. Puis, lors de la formation des cordons séminifères, son expression diminue dans les cellules de Sertoli

alors qu'elle augmente dans les cellules de Leydig fœtales (Ikeda *et al.*, 1994). L'invalidation conditionnelle de *Sf1* dans les cellules de Leydig murines entraîne la formation de testicules hypoplasiques. L'étude de ces testicules mutants a mis en évidence une diminution de l'expression *Cyp11a* (Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1) et *StAR* (pour steroidogenic acute regulatory protein), deux marqueurs des cellules de Leydig fœtales nécessaires pour la production de testostérone (Jeyasuria *et al.*, 2004).

Une diminution de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse est également observée dans les testicules de souris délétés pour le gène *Arx* (pour *X-linked aristaless-related homeobox gene*) (Kitamura *et al.*, 2002). Ce gène est exprimé dans l'interstitium des gonades mâles dès 12.5 *jpc*, lieu où sont retrouvés les précurseurs des cellules de Leydig fœtales (Miyabayashi *et al.*, 2013). L'invalidation de *Arx* chez la souris entraîne une forte diminution du nombre de cellules de Leydig fœtales durant l'embryogenèse du testicule liée à une réduction du nombre de cellules progénitrices (Miyabayashi *et al.*, 2013). Ainsi, *Sf1* et *Arx* interviennent dans l'établissement de la population des cellules de Leydig ainsi que la régulation de la stéroïdogénèse.

Une fois différenciées, les cellules de Leydig fœtales ne prolifèrent pas. Ce sont les cellules progénitrices présentes dans le milieu interstitiel qui prolifèrent durant toute la vie embryonnaire pour donner des cellules de Leydig fœtales (Orth, 1982).

Durant la vie embryonnaire, les cellules de Leydig possèdent toutes les enzymes nécessaires à la production de testostérone à l'exception de la 17 β -hydroxylase déshydrogénase type 3 (HSD17B3) qui est indispensable pour la réaction finale de production de la testostérone. L'androstenedione est donc l'androgène produit principalement par les cellules de Leydig fœtales. Les cellules de Sertoli sont alors primordiales pour la production de testostérone : uniquement durant la période fœtale elles synthétisent la HSD17B3 et utilisent l'androtéstotérone issue des cellules de Leydig pour la convertir en testostérone, ceci à partir de 13,5 *jpc* (Baker *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 2013). Les androgènes produits permettent la masculinisation du fœtus en initiant la formation des organes génitaux externes (scrotum et pénis), le développement des canaux de Wolff (canaux qui permettront par la suite la formation de l'épididyme, des canaux déférents, des vésicules séminales et du canal éjaculateur) et la masculinisation du cerveau (réseau neuronal spécifique).

iv. Différenciation des cellules myoïdes périvitubulaires

Les cellules myoïdes périvitubulaires sont visibles dès 13,5 *jpc* chez la souris (**Figure 7 A -B**), soit peu de temps après la formation des cordons séminifères (Jeanes *et al.*, 2005). Elles se localisent à la périphérie des tubes séminifères en contact avec les cellules de Sertoli où elles jouent plusieurs rôles :

(i) elles produisent des facteurs essentiels pour la formation de la matrice extracellulaire, appelée la lamina propria, en collaboration avec les cellules de Sertoli (Skinner *et al.*, 1985). Cette matrice extracellulaire est indispensable pour la structure et l'intégrité des cordons séminifères. (ii) Les cellules myoïdes participent à isoler les tubes séminifères du milieu interstitiel. (iii) Enfin, elles permettent la contraction des tubes séminifères requis pour l'excrétion des spermatozoïdes à l'âge adulte. Yao *et al.*, (2002) ont mis en évidence que la différenciation des cellules myoïdes périvitubulaires est sous l'influence du facteur DHH produit par les cellules de Sertoli. L'origine de ces cellules reste incertaine. Néanmoins, il a été démontré qu'elles ne sont pas issues du mésonéphros (Combes *et al.*, 2009; Cool *et al.*, 2008).

v. *Les autres cellules somatiques testiculaires*

D'autres types cellulaires sont également retrouvés dans le testicule comme les cellules immunitaires présentes dans le tissu interstitiel. Le testicule est décrit comme un organe « immunologiquement privilégié » puisqu'il empêche une réaction auto-immune du système immunitaire contre les cellules germinales. La barrière hémato-testiculaire isole également les cellules germinales du système immunitaire. L'homéostasie immunitaire dans le testicule est néanmoins indispensable pour éviter des réactions auto-immunes ou la formation d'orchite (inflammation du testicule) qui sont des causes d'infertilité chez le mâle (Hedger, 2002). De plus, le testicule peut être infecté par divers agents microbiens amenés par la circulation sanguine ou remontant par les voies urogénitales. Le système immunitaire inné du testicule doit donc pouvoir se défendre contre les agressions microbiennes (Zhao *et al.*, 2014). Parmi les cellules immunitaires présentes dans le testicule, la majorité sont des macrophages et représentent 20% de la population des cellules interstitielles chez la souris (Hedger, 2002; Zhao *et al.*, 2014). Cette population de macrophages doit être contrôlée : il a été mis en évidence que les macrophages testiculaires participent au développement d'orchite auto-immune reproduite expérimentalement. Les macrophages stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires et activent les cellules immunitaires T (Rival *et al.*, 2008).

En conclusion de cette partie, la morphogenèse du testicule ainsi que la différenciation du sexe mâle sont également dépendantes de la mise en place des cellules de soutien. Chaque type cellulaire joue un rôle indispensable dans l'organisation du testicule embryonnaire. Ces étapes sont déterminantes pour la fonction principale du testicule adulte : la spermatogenèse. A l'inverse, les cellules germinales ne sont pas actives pour la morphogenèse du testicule fœtal.

c. *Inhibition de l'entrée en méiose des cellules germinales mâles*

La méiose des cellules germinales est initiée par le gène *Stra8* (pour *Stimulated by Retinoic Acide Gene 8*) à des stades différents en fonction du sexe. Chez la souris, les cellules germinales XX

arrêtent de proliférer et entrent en méiose à partir de 13,5 *jpc*. Les cellules germinales XY du testicule foetal continuent à proliférer et deviennent progressivement quiescentes entre 12,5 et 14,5 *jpc* (Western *et al.*, 2008) : elles sont bloquées au stade G0/G1 du cycle cellulaire. La méiose des CGP XY est initiée après la naissance.

L'initiation de la méiose n'est pas seulement un événement intrinsèque aux cellules germinales : il dépend des facteurs environnementaux produits par les cellules somatiques gonadiques. Ainsi, l'entrée en méiose des cellules germinales XX serait enclenchée durant la vie embryonnaire par une substance induisant la méiose (MIS, pour *meiosis-inducing substance*). A l'inverse, une substance empêchant la méiose (MPS pour *meiosis-preventing substance*) inhiberait l'action du MIS et donc l'entrée en méiose des cellules germinales XY.

L'invalidation de *Dazl* chez la souris empêche les CGP d'initier la méiose pour les cellules germinales XX ou d'entrer en quiescence pour les XY (Gill *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2008). *Dazl* permet aux CGP de répondre aux signaux présents dans la gonade XX ou XY et d'induire l'ovogenèse ou la spermatogenèse (**Figure 8A-B**). Son expression est cependant contrôlée dans les cellules germinales XY pour éviter une initiation précoce de la méiose. En effet, des expériences de RT-qPCR ont montré qu'une surexpression de *Dazl* (suite au retrait de l'extrémité 3'UTR du gène *Dazl*) dans les gonades embryonnaires XY (15,5 *jpc*) entraîne une surexpression des gènes méiotiques tels que *Sycp3* (pour *synaptonemal complex protein 3*) et *Stra8* (Kato *et al.*, 2016).

Différents modèles murins knockout ont montré, qu'après la naissance, dans la gonade mâle, *Stra8* est indispensable pour le passage d'un mode de divisions mitotiques vers celui de divisions méiotiques (Anderson *et al.*, 2008; Mark *et al.*, 2008). *Stra8* est un gène stimulé par l'acide rétinoïque (AR), donc dans les gonades embryonnaires XY, l'initiation de la méiose par l'AR doit être inhibée. L'enzyme CYP26B1 empêcherai l'entrée en méiose en dégradant l'AR (MacLean *et al.*, 2001; White *et al.*, 2000). CYP26B1 est sécrétée par les cellules de Sertoli de 12,5 à 15,5 *jpc* avec un pic d'expression à 13,5 *jpc* (Bowles *et al.*, 2006). Lorsque *Cyp26b1* est invalidé chez la souris (MacLean *et al.*, 2007) ou inhibé dans des testicules en culture (Bowles *et al.*, 2006), *Stra8* et *Sycp3* sont alors régulés à la hausse. Ainsi, CYP26B1 dégrade l'AR et protège ainsi les cellules germinales mâles fœtales d'une exposition à l'AR. *Cyp26b1* prévient ainsi une initiation de la méiose dans le testicule foetal en dégradant l'AR (**Figure 8B**).

CYP26B1 est nécessaire mais il n'est pas suffisant pour empêcher la méiose des cellules germinales. L'expression de *Cyp26b1* dans les cellules de Sertoli diminue progressivement au fur et à mesure que le développement embryonnaire progresse (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006) et d'autres facteurs sont nécessaires pour maintenir une répression de la méiose. Les cellules germinales

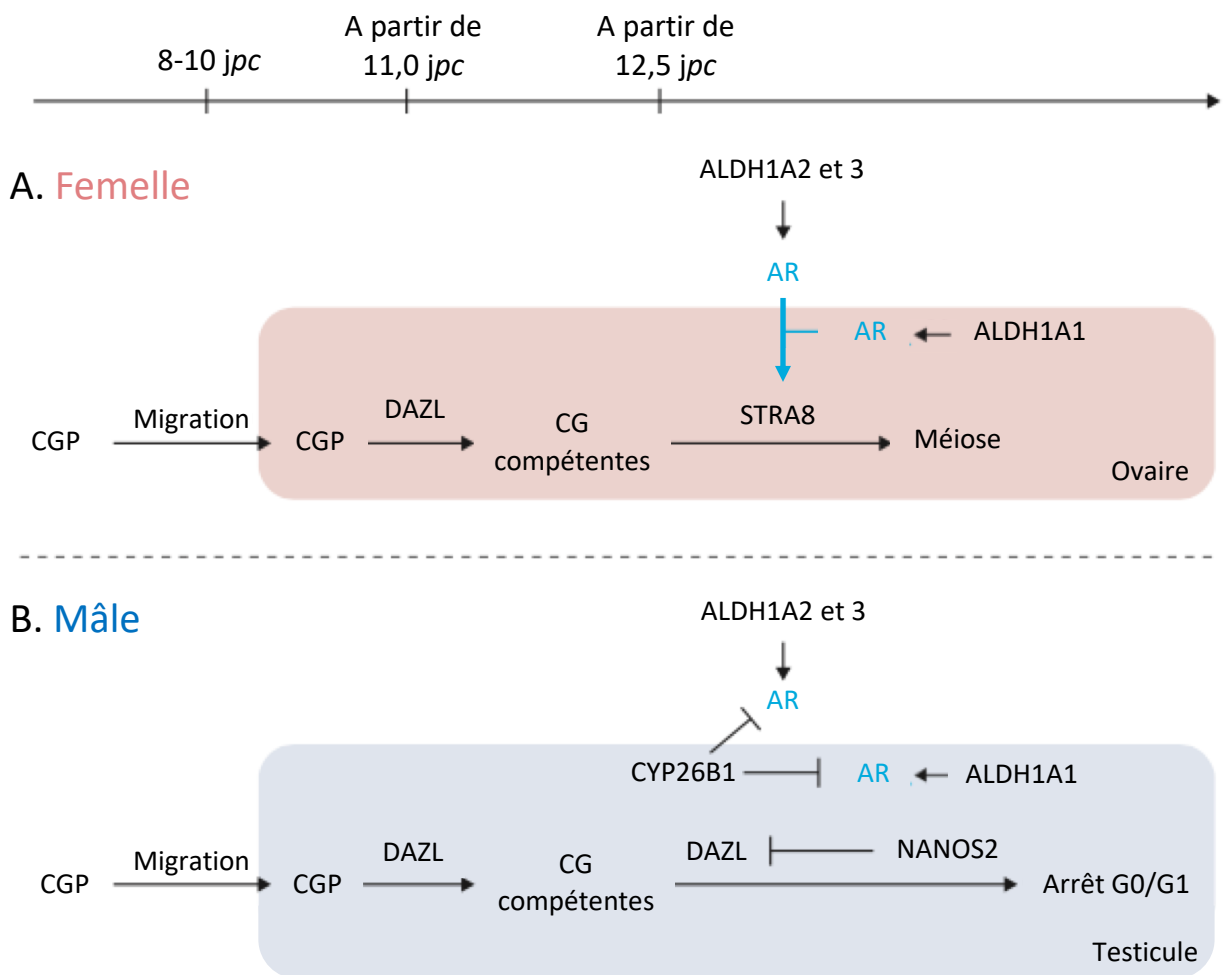


Figure 8: Représentation schématique du développement des cellules germinales dans les deux sexes chez la souris.

Les rectangles de couleur représentent les gonades différenciées en ovaire (rouge) ou en testicule (bleu). Les protéines ALDH1A2 et ALDH1A3 sont produites par le mésonéphros alors que les protéines ALDH1A1 et CYP26B1 sont produites dans la gonade. Enfin DAZL, STRA8 et NANOS2 sont produits dans les cellules germinales (CG).

D'après Endo *et al.*, 2019.

XY *Nanos2*^{-/-} présentent une augmentation de l'expression de *Stra8* à 14,5 *jpc* induisant une initiation précoce de la méiose (Suzuki and Saga, 2008), pour entrer en apoptose à partir de 15,5 *jpc* (Tsuda, 2003). Pourtant l'expression de *Cyp26b1* dans les testicules *Nanos2*^{-/-} est comparable à l'expression dans les testicules *Nanos*^{+/-} (Suzuki and Saga, 2008). Dans des conditions normales, la protéine de liaison à l'ADN, NANOS2 (pour *Nanos C2Hc-type zinc finger 2*), est exprimée spécifiquement dans les gonades XY à partir de 12,5 *jpc* (Tsuda, 2003) et persiste dans le testicule adulte. NANOS2 semble réguler *Dazl* dans les CGP. Il a été mis en évidence que l'expression de *Dazl* dans les gonades XY est inversement proportionnelle au niveau de protéine NANOS (Suzuki *et al.*, 2007). De plus, l'expression de *Dazl* est significativement augmentée dans les gonades *Nanos2*^{-/-} par rapport au contrôle à 15,5 *jpc* (Kato *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que NANOS2 réprime l'expression de *Dazl* à partir de 12,5 *jpc* spécifiquement dans les gonades mâles empêchant l'initiation de la méiose (**Figure 8B**).

Autre facteur intervenant dans l'initiation de la méiose fœtale mâle: FGF9. Le phénotype des souris *Fgf9*^{-/-} rappelle celui des souris *Nanos2*^{-/-} avec une initiation précoce de la méiose dans les cellules germinales XY (DiNapoli *et al.*, 2006). L'expression de *Nanos2* est régulée positivement dans des cultures de gonades de souris mâle et femelle à 12,5 et 13,5 *jpc* en présence de FGF9 (Barrios *et al.*, 2010; Bowles *et al.*, 2010). FGF9 est donc capable de stimuler l'expression de *Nanos2* dans les gonades embryonnaires des deux sexes. A l'inverse la présence d'acide rétinoïque dans le milieu de culture entraîne une inhibition de l'expression de *Nanos2* dans les testicules embryonnaires (Barrios *et al.*, 2010). Ces résultats montrent que FGF9 (impliqué au préalable dans la différenciation testiculaire) empêche aussi l'initiation de la méiose dans les cellules germinales de testicules fœtaux en s'opposant à l'effet de l'AR sur l'expression de *Nanos2*. Puis, l'expression de *Nanos2* est nécessaire pour prendre le relais dans l'inhibition de l'initiation de la méiose lorsque l'expression de *Cyp26b1* diminue.

La combinaison de ces 3 facteurs, *Cyp26b1*, *Nanos2* et *Fgf9* sont donc indispensables pour prévenir d'une méiose fœtale mâle. Dans les gonades femelles, sans notamment CYP26B1, l'AR n'est pas dégradé et peut donc agir sur les CGP en induisant l'expression de *Stra8* (**Figure 8A**).

Deux études récentes ont mis en évidence que l'expression de *Stra8* serait indépendante de l'expression de l'AR dans les ovaires fœtaux de souris. L'absence d'expression d'AR suite à la délétion des gènes *Aldh1a1* (pour *aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1*), *Aldh1a2* et *aldh1a3* codant pour les enzymes de synthèse de l'AR diminue faiblement l'expression de *Stra8* mais n'empêche pas l'initiation de la méiose (Chassot *et al.*, 2020). Les mêmes observations ont été faites dans des ovaires de souris dépourvues des 3 récepteurs nucléaires de l'AR nommés RARA (pour nuclear retinoic acid receptors A), RARB et RARG (Vernet *et al.*, 2020). D'après ces études, l'AR ne serait pas nécessaire pour

l'initiation de la méiose des cellules germinales dans l'ovaire fœtal (également mis en évidence dans le testicule post natal : voir la partie **Introduction.II.B.2.a**). Ainsi, de nouvelles études doivent être réalisées pour mieux comprendre les mécanismes intervenant dans l'initiation de la méiose dans l'ovaire fœtal ainsi que les mécanismes d'inhibition de l'entrée en méiose des cellules germinales dans le testicule fœtal.

II. Du testicule fœtal à la mise en place de la fertilité mâle

Chez les mammifères, le testicule situé dans le scrotum (enveloppe qui entoure les testicules), est l'organe de la reproduction chez le mâle. Il possède deux fonctions simultanées : une fonction exocrine (la production des spermatozoïdes) et une fonction endocrine (la production des androgènes). Ces fonctions sont assurées par différents types cellulaires.

Le testicule est recouvert d'un tissu conjonctif appelé l'albuginée. Il est divisé en compartiments appelés lobules qui contiennent les tubes séminifères (ou cordons testiculaires). Les spermatozoïdes sont produits dans les tubes séminifères à partir des cellules germinales. Les cellules de Sertoli englobent les cellules germinales à plusieurs niveaux de différenciation et s'étendent sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère. Les cellules de Sertoli assurent la survie des cellules germinales et leurs différenciations. Les tubes séminifères sont entourés par une lame basale puis par les cellules péritubulaires myoïdes : ce sont des cellules musculaires lisses qui se contractent pour expulser les spermatozoïdes et le liquide intra-testiculaire présent dans la lumière des tubes vers l'épididyme (**Figure 9**). Les cellules de Leydig, qui assurent la production d'androgènes à l'âge adulte, ainsi que le système de circulation sanguine, lymphatique et les nerfs sont à l'extérieur des tubes séminifères dans l'espace interstitiel (**Figure 10**). Les spermatozoïdes expulsés des tubes séminifères vont cheminer par le *Rete Testis*, structure où tous les cordons séminifères se rejoignent dans le testicule. Puis les spermatozoïdes passent par les canaux efférents puis rejoignent la tête de l'épididyme. L'épididyme coiffe le testicule et assure le transport, la conservation et la maturation des spermatozoïdes. Les canaux efférents fusionnent en un canal unique appelé le canal épидидymaire au niveau de l'épididyme. Enfin les spermatozoïdes sortent de l'épididyme par le canal déférent (*vas deferent*) (**Figure 9**).

A. Le testicule post natal

A la naissance, le testicule, formé durant la période embryonnaire, n'est toujours pas apte à réaliser la spermatogenèse. Les cellules germinales restent quiescentes jusqu'à la puberté où l'axe hypothalamo-hypophysaire se met en place. Les cellules de Sertoli vont évoluer vers leur stade adulte alors que les cellules de Leydig fœtales seront remplacées par les cellules de Leydig adultes. Tous ces

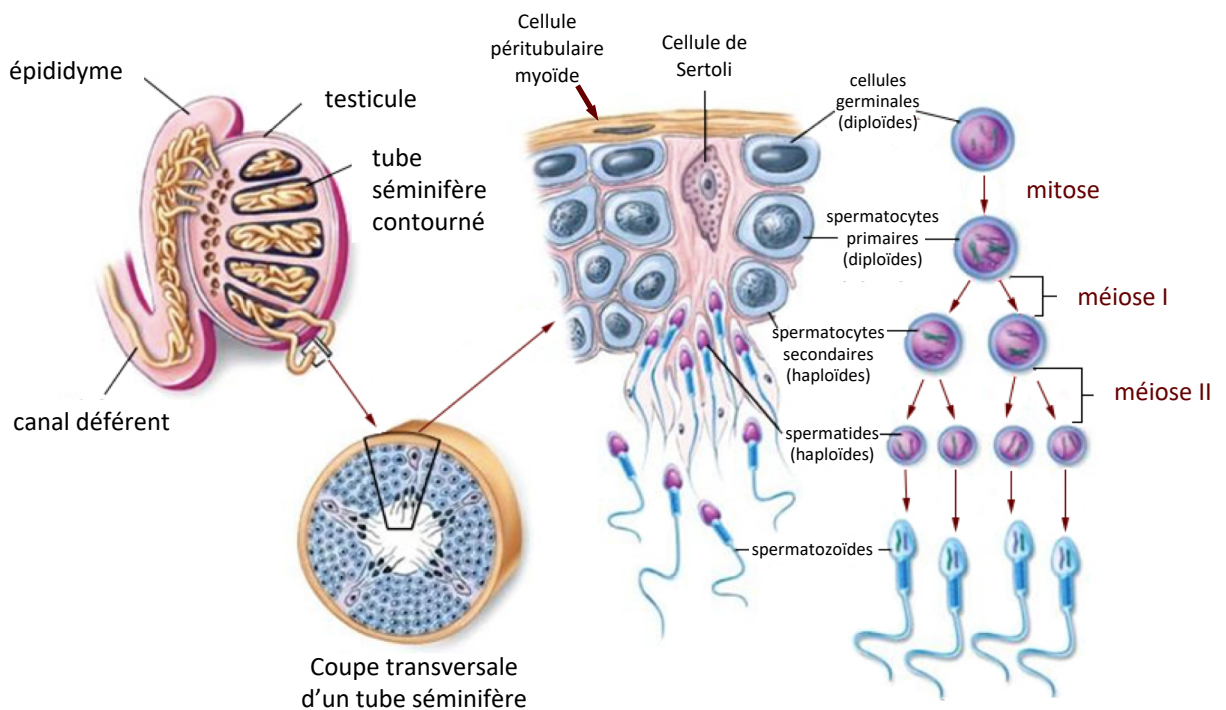


Figure 9 : Organisation du testicule en coupe transversale.

Le testicule contient les tubes séminifères organisés en lobules. Les tubes séminifères se rejoignent au niveau du *Rete testis* pour aboutir dans l'épididyme. A la sortie de l'épididyme, il ne reste plus qu'un seul canal appelé le canal déférent. La coupe transversale d'un tube séminifère permet d'observer les cellules qui le composent : les cellules de Sertoli entourent les cellules germinales qui réalisent les différentes étapes de la spermatogenèse.

Issue de De Boeck Université, 2007.

phénomènes contribuent à la croissance et au développement d'un testicule mature qui, à partir de la puberté, pourra produire des spermatozoïdes fonctionnels.

1. *Maturation des cellules de Sertoli*

Dans le testicule adulte, les cellules de Sertoli ont une forme pyramidale avec le noyau situé en périphérie des tubes séminifères (**Figure 10**). Elles assurent plusieurs rôles comme la nutrition des cellules germinales et la formation de la barrière hémato-testiculaire. Les cellules de Sertoli créent un environnement unique dans le testicule permettant aux cellules germinales de réaliser la spermatogenèse.

Les cellules de Sertoli restent immatures jusqu'à la puberté chez plusieurs espèces tel que le rat, le singe rhésus, le ouistiti et l'Homme (Sharpe *et al.*, 2003). Les cellules de Sertoli immatures prolifèrent pendant la vie embryonnaire périnatale et pré-pubertaire pour atteindre un nombre suffisant à la puberté. Chaque cellule de Sertoli mature soutient un nombre limité de cellules germinales effectuant la spermatogenèse. Ainsi, la taille de la population des cellules de Sertoli adultes détermine la quantité de spermatozoïdes produit durant la vie reproductive (Berndtson *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1984; Orth *et al.*, 1988). Différents facteurs sont donc exprimés dans les testicules pour favoriser la multiplication par mitose des cellules de Sertoli immatures durant la vie pré-pubertaire. La FSH (pour hormone folliculostimulant), IGF-1 (pour insulin-like growth factor 1) ainsi que l'Activine A maintiennent les cellules de Sertoli immatures et favorisent la mitose de ces cellules durant la vie embryonnaire et périnatale (Abel *et al.*, 2000; Mendis *et al.*, 2011; Pitetti *et al.*, 2013).

La FSH est une hormone gonadotrope sécrétée par la glande pituitaire antérieure. Elle agit en se fixant sur ces récepteurs FSHR exprimés au niveau des cellules de Sertoli (Heckert and Griswold, 1993). Des expérimentations d'hémicastration chez des rats de 3 jpp, ont mis en évidence une hypertrophie compensatrice du testicule intact : celui-ci présente des taux de FSH élevés associés à une augmentation de la prolifération de cellules de Sertoli (Orth, 1984). L'invalidation des récepteurs FSHR chez la souris n'entraîne pas d'infertilité chez le mâle, mais une diminution de la taille des testicules avec des défauts partiels de la spermatogenèse (Abel *et al.*, 2000; Dierich *et al.*, 1998). A l'inverse, des souris *hpg* (déficiente en GnRH, LH, FSH et androgènes) infertiles, avec une diminution de la taille testiculaire chez les mâles, présentent une augmentation de la taille des testicules lorsque les transgènes FSH ou FSHR⁺ (récepteur mutant constitutionnellement actif) sont exprimés. L'expression transgénique de FSH ou FSHR⁺ augmente le nombre de cellules de Sertoli dans les testicules par rapport aux souris *hpg* témoins (Allan *et al.*, 2004). Le même phénotype que précédemment est observé chez les souris mâles mutées pour les récepteurs *Insr* (pour *insulin receptor*) et *Igf1r* (IGF1 receptor) qui sont normalement exprimés dans les cellules de Sertoli immatures

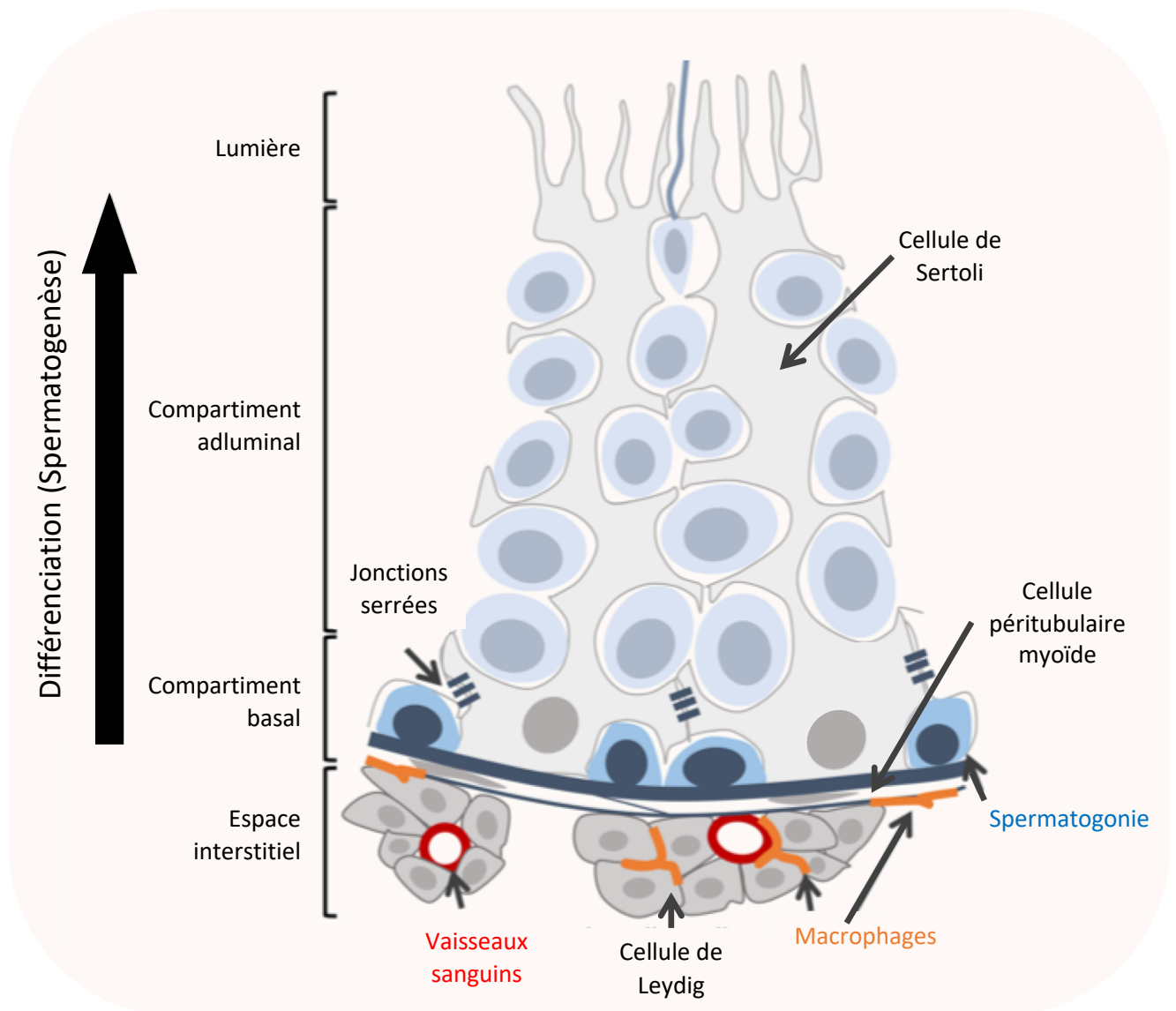


Figure 10 : Organisation de l'épithélium séminifère.

Entourées d'une lame basale, les cellules de Sertoli forment les tubes séminifères en englobant les cellules germinales. Les tubes séminifères peuvent être divisés en 3 compartiments : le compartiment basal où les cellules de Sertoli polarisées reposent sur la lame basale avec les spermatogonies souches et les spermatocytes en pré-leptotène ; le compartiment adluminal comprenant les cellules germinales en cours de différenciation (spermatocytes et spermatides) ; et enfin la lumière des tubes séminifères où se retrouvent les spermatozoïdes ayant achevés la spermatogénèse.

En dehors des tubes séminifères, l'espace interstitiel comprend les cellules de Leydig en îlot autour de vaisseaux sanguins, les macrophages et les cellules péritubulaires myoïdes.

Adapté de La et Hobbs, 2019

(Pitetti *et al.*, 2013). Ainsi, la FSH et le système insulín/IGF régulent la prolifération des cellules de Sertoli immatures en activant le récepteur FSHR présent sur ces cellules.

C'est autour de la puberté que les cellules de Sertoli arrêtent de proliférer et deviennent matures. D'autres facteurs sont alors sécrétés pour la maturation des cellules de Sertoli comme la testostérone, l'hormone thyroïdienne ou l'acide rétinoïque (Buzzard *et al.*, 2003). L'AR régule négativement la FSH et l'activine A inhibant ainsi la prolifération des cellules de Sertoli (Nicholls *et al.*, 2013). Des taux non physiologiques de l'hormone thyroïdienne permettent d'observer des cinétiques anormales de maturation des cellules de Sertoli : un hypothyroïdisme entraîne une augmentation de la taille des testicules (Auharek and de França, 2010; Cooke and Meisami, 1991) alors qu'un hyperthyroïdisme avant la puberté entraîne une diminution de la taille testiculaire chez le rat et la souris (Auharek and de França, 2010; van Haaster *et al.*, 1993). Ainsi, un niveau faible d'hormone thyroïdienne empêche la maturation des cellules de Sertoli qui continuent à proliférer alors qu'un taux trop élevé entraîne une maturation précoce des cellules de Sertoli et donc un arrêt des mitoses. Le nombre de cellules de Sertoli (dépendant de la prolifération des cellules de Sertoli immatures) détermine la taille des testicules. Ces études mettent en évidence le rôle de ces facteurs dans l'arrêt de la prolifération et la maturation des cellules de Sertoli.

La maturation des cellules de Sertoli est observée avec l'apparition de la lumière des tubes séminifères : les cellules de Sertoli matures produisent le fluide testiculaire au niveau apical qui s'accumule au centre des tubes et entraîne l'apparition de la lumière des tubes. En même temps, les cellules de Sertoli établissent des jonctions serrées entre elles qui sont essentielles pour la mise en place de la barrière hémato-testiculaire vers 15 jpp (Willems *et al.*, 2010). Ces jonctions permettent de délimiter deux zones dans l'épithélium séminifère : la zone basale comprenant les spermatogonies et les spermatocytes au stade pré-leptotène, la zone adluminaire/apicale comprenant les stades suivants de la spermatogenèse (Mruk and Cheng, 2004) (**Figure 10**). Cette barrière est indispensable pour la survie des cellules germinales en différenciation : elle joue un rôle de barrière immunitaire en protégeant les cellules haploïdes qui présentent des caractéristiques antigéniques spécifiques. Ainsi, les cellules de Sertoli servent de barrière entre les cellules germinales et le système immunitaire, mais elles peuvent également moduler la réponse immunitaire en sécrétant des facteurs immunorégulateurs (Kaur *et al.*, 2014).

Les cellules de Sertoli ont également un rôle essentiel de soutien et de nutrition pour les cellules germinales. Elles sécrètent des facteurs de croissance et des glycoprotéines importantes pour la spermatogenèse. Ces glycoprotéines interviennent dans le transport des ions ou des hormones, dans le remodelage des tissus lors de la spermiation par exemple, et elles composent la membrane basale

située entre les cellules de Sertoli et les cellules péritubulaires myoïdes (Griswold, 1988; Sofikitis *et al.*, 2008). De plus, les cellules de Sertoli sont essentielles pour la migration des cellules germinales de la lame basale vers la lumière des tubes.

Enfin, les cellules de Sertoli présentent un rôle dans la phagocytose des cellules mortes. Les cellules germinales peuvent s'auto-renouveler par mitose, se différencier lors de la spermatogenèse mais elles peuvent également réaliser une mort programmée appelée apoptose, même dans les testicules normaux (Allan *et al.*, 1992). Ces cellules mortes sont rapidement phagocytées par les cellules de Sertoli pour empêcher la fuite de leur contenu nocif dans les tubes séminifères. Lors de la spermiation, les corps résiduels rejetés par les spermatozoïdes (décrit dans la partie **Introduction.II.D.5**) sont également phagocytés par les cellules de Sertoli. Toutes les actions de phagocytose par ces cellules de Sertoli leur fournissent également de l'énergie (Hai *et al.*, 2014).

Les cellules de Sertoli sont donc indispensables pour l'architecture du testicule mais également pour la nutrition et la survie des cellules germinales. Ces cellules sont multifonctionnelles et essentielles pour assurer la fertilité d'un individu.

2. Les cellules de Leydig adultes

Les cellules de Leydig adultes sont organisées en îlot dans l'espace interstitiel à proximité des vaisseaux sanguins. Elles sont la source principale d'androgènes chez l'homme et elles produisent de la testostérone nécessaire au déroulement de la spermatogenèse dans les testicules adultes. Contrairement aux cellules de Leydig fœtales, les cellules de Leydig adultes expriment toutes les enzymes nécessaires pour la stéroïdogenèse. C'est à partir du cholestérol que les cellules de Leydig peuvent produire de la testostérone. Le cholestérol passe dans la mitochondrie où il est transformé par l'enzyme P450_{sc} (CYP11A) en prégnénolone. La prégnénolone est transportée dans le réticulum endoplasmique lisse pour subir les réactions permettant d'aboutir à la production de testostérone. Les différentes étapes de la stéroïdogenèse des cellules de Leydig sont représentées sur la **figure 11**.

Après la naissance, les cellules de Leydig, qui se sont différenciées durant la vie embryonnaire, voient leur nombre diminuer et vont progressivement être remplacées par les cellules de Leydig adultes (Haider, 2004) bien qu'un certain nombre de cellules de Leydig fœtales subsistent dans les testicules adultes chez le rat (Ariyaratne and Chamindrani Mendis-Handagama, 2000; Kaftanovskaya *et al.*, 2015). A partir de la naissance, le nombre de cellules de Leydig dites adultes augmente rapidement durant la période pré-pubertaire. Dans un premier temps, elles sont immatures puis deviennent matures. L'origine des cellules progénitrices des cellules de Leydig adultes n'est toujours pas certaine. En effet, des études chez le rat et la souris laissent penser que les cellules de Leydig adultes auraient des cellules progénitrices différentes des cellules de Leydig fœtales (Ge *et al.*, 2006;

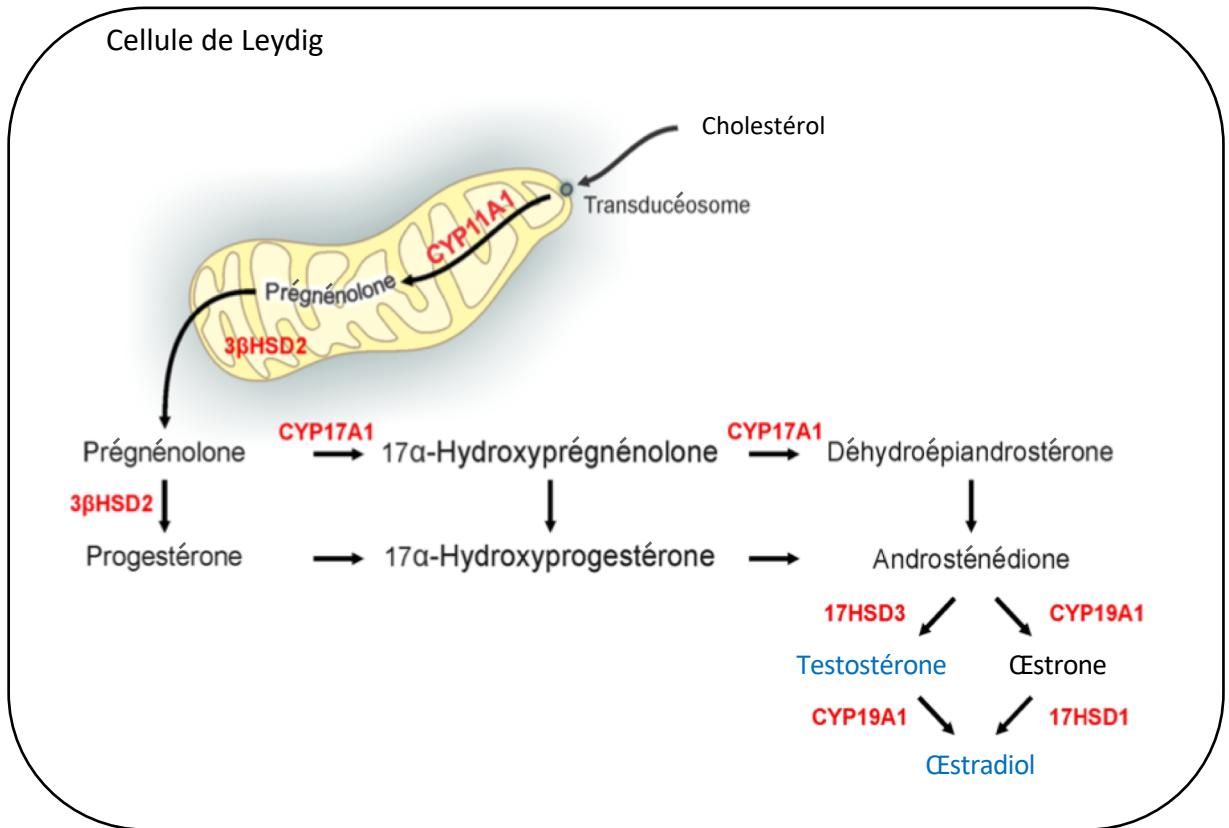


Figure 11 : Production des androgènes par les cellules de Leydig.

Les cellules de Leydig transforment le cholestérol en androgènes. Le cholestérol pénètre dans la mitochondrie grâce au transducéosome composé de protéines cytosoliques et mitochondriales. Le cholestérol est métabolisé en prégnénolone par CYP11A1, lui-même métabolisé en progestérone par la 3βHSD2 présente dans la membrane plasmique des mitochondries et dans le réticulum endoplasmique. Le reste de la stéroïdogénèse se déroule dans le cytoplasme des cellules de Leydig. La prégnénolone et la progestérone sont métabolisées par CYP17A1 en 17α-hydroxypregnenolone et 17α-hydroxyprogestérone respectivement. La même enzyme métabolise la 17α-hydroxypregnenolone en déhydroépiandrostérone et la 17α-hydroxyprogestérone en androsténédione. Enfin l'androsténédione est métabolisée en testostérone par l'enzyme 17HSD3 ou en œstrone par l'enzyme Cyp19A1. Ces deux hormones peuvent être métabolisées en œstradiol par les enzymes CYP19A1 ou 17HSD1.

CYP11A1 : cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1; 3βHSD2 : 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase ; CYP17A1 : cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1; CYP19A1 : cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 ; 17HSD3 : 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase 3; 17HSD1 : 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase 1.

Issue de Zirkin et Papadopoulos; 2018

Kaftanovskaya *et al.*, 2015). D'autres mettent en évidence que ces deux populations de cellules de Leydig pourraient avoir une origine commune chez la souris (Barsoum *et al.*, 2013). Enfin, une troisième hypothèse serait que les cellules de Leydig fœtales sont capables de se différencier pour se redifférencier en cellules de Leydig adultes (Shima *et al.*, 2018) (**Figure 12**). En plus d'être nécessaires pour la différenciation des cellules de Leydig fœtales (vue dans la partie **Introduction.I.B.3.b.iii**), les facteurs DHH et PDGF-A sécrétés par les cellules de Sertoli sont également nécessaires pour la différenciation des cellules de Leydig adultes (Clark *et al.*, 2000; Gnassi *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2002). En absence de ces facteurs, les cellules de Leydig adultes ne se développent pas.

Le rôle des androgènes, via leurs récepteurs et de l'hormone LH (hormone lutéinisante) dans la maturation des cellules de Leydig adultes a été mis en évidence dans plusieurs études. Les cellules de Leydig adultes sont capables de se différencier en absence des récepteurs aux androgènes mais elles n'acquièrent pas toutes les caractéristiques des cellules de Leydig adultes (O'Shaughnessy *et al.*, 2002). L'inactivation des récepteurs aux androgènes entraîne une diminution du nombre de cellules de Leydig adultes de 40% par rapport à des souris contrôles du même âge (O'Shaughnessy *et al.*, 2002). Les souris XY dites *Tfm* (pour *XY testicular feminized*), avec récepteurs aux androgènes non fonctionnels, présentent des organes génitaux externes féminisés et des testicules de petites tailles en position abdominale. Leurs cellules de Leydig présentent un défaut de maturation avec une diminution du niveau de testostérone circulant (Murphy and O'Shaughnessy, 1991). Ainsi, la maturation des cellules de Leydig par l'action des androgènes (via ces récepteurs) est primordiale pour une activité normale de ces cellules.

La LH intervient dans la maturation des cellules de Leydig adultes. Des expériences *in vitro* montrent que la production de testostérone par les cellules de Leydig est plus importante lorsque les cellules sont mises en culture avec des androgènes et de la LH que lorsque le milieu contient seulement des androgènes (Hardy *et al.*, 1990). De plus, l'étude de souris invalidées pour le récepteur à la LH (LuRKO) met en évidence une diminution du nombre et de la taille des cellules de Leydig adultes (Zhang *et al.*, 2001). Cette diminution de taille des cellules de Leydig traduit l'incapacité de transition des cellules de Leydig immatures à matures. Ainsi, la signalisation LH agit sur la maturation des cellules de Leydig adultes pour assurer les fonctions de production des androgènes chez les mâles.

B. Acquisition de la fertilité du testicule : la spermatogenèse

La spermatogenèse est une des étapes clés pour l'acquisition de la fertilité masculine. Elle permet la différenciation des cellules souches diploïdes appelées spermatogonies en cellules haploïdes hautement différenciées appelés spermatozoïdes. Les cellules germinales quiescentes (ou pro-spermatogonies) bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, depuis 14,5 *jpc* chez la souris, se

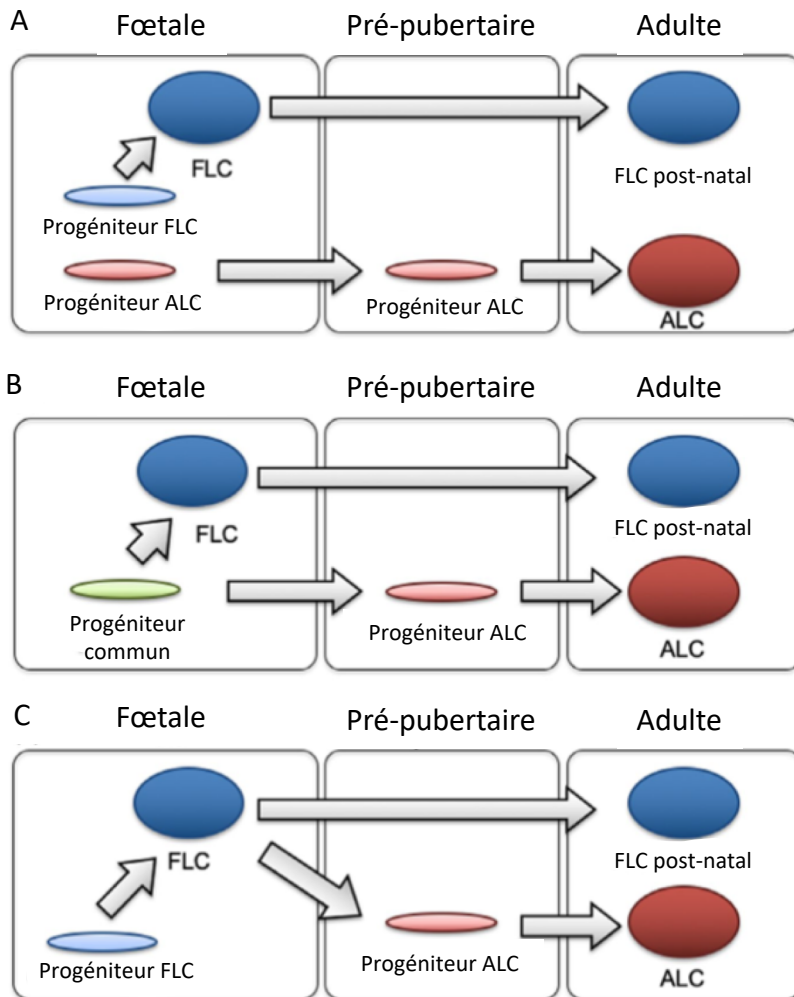


Figure 12 : Modèles de différenciation des cellules de Leydig adultes.

(A) Les deux populations des cellules de Leydig (adultes et fœtales) trouvent leur population de cellules progénitrices dès la période fœtale. (B) Les cellules de Leydig fœtales et adultes ont des cellules progénitrices communes se différencient en cellules de Leydig fœtales durant la vie embryonnaire et en cellules de Leydig adultes à la puberté. (C) Durant la vie fœtale, il n’y a que des cellules progénitrices des cellules de Leydig fœtales. Les cellules de Leydig fœtales se dédifférencient avant la puberté en progénitrices de cellules de Leydig adultes pour se différencier à la puberté.

FLC : cellules de Leydig fœtales ; ALC : Cellules de Leydig adultes.

Issue de Shima *et al.*, 2019

différencient en cellules souches spermatogoniales (CSS aussi appelées Spermatogonies A_s). Chez la souris, la première vague de spermatogenèse est initiée autour de 2 jpp et se termine à 35 jpp (Yoshida *et al.*, 2006). La première vague de spermatogenèse est réalisée à partir d'une sous population de gonocytes : ces cellules entrent en apoptose massive au stade pachytène de prophase de méiose I assurant la régulation du ratio de spermatozoïdes pour chaque cellule de Sertoli (Hess and Renato de Franca, 2008; O'Shaughnessy, 2014). Cette première vague de spermatogenèse est également essentielle pour l'établissement de la niche spermatogonale (Hess and Renato de Franca, 2008). La seconde vague de spermatogenèse qui démarre vers 7/8 jpp. Toutes les vagues de spermatogenèse qui suivront dériveront des CSS. Chez l'homme, la spermatogenèse est initiée autour de la puberté vers 10/13ans. La durée de la spermatogenèse est constante pour une espèce donnée mais elle est différente entre les espèces : elle dure 35 jours chez la souris, 74 jours chez l'homme (Clermont, 1972).

La spermatogenèse est divisée en 3 grandes étapes : la mitose, la méiose et la spermiogénèse (**Figure 13**). Ces étapes se déroulent de façon centripète dans les tubes séminifères avec les cellules les moins différenciées situées à la périphérie des tubes (les cellules germinales en mitose) et les cellules les plus différenciées à la lumière des tubes. Ainsi, les cellules germinales s'organisent en couches superposées de cellules en différenciation et évoluent de façon régulière et coordonnée entre les différentes générations. Cette organisation permet d'associer les cellules germinales en différenciation en différents stades nommés les stades de l'épithélium séminifère (**Figure 14**). Ils se répètent dans le temps et constituent les cycles de l'épithélium séminifère. Le nombre de stades de l'épithélium séminifère est spécifique à chaque espèce : 12 chez la souris, 14 chez le rat, 6 chez l'homme (Clermont, 1972).

1. La mitose

La mitose est une division cellulaire retrouvée chez les organismes eucaryotes et nommée division non sexuée. Elle est précédée d'une étape de duplication de l'ADN suivie de la division cellulaire permettant, à partir d'une cellule mère d'obtenir deux cellules filles strictement identiques génétiquement. La mitose est divisée en quatre phases qui correspondent à des changements morphologiques dans la cellule :

- La prophase : les chromosomes se condensent et la membrane nucléaire se désagrège.
- La métaphase : les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale et ils sont accrochés à partir des kinétochores (structure multi-protéiques située au niveau des centromères) aux deux pôles de la cellule par des microtubules.
- L'anaphase : séparation des deux chromatides de chaque chromosome qui migrent chacun à un pôle opposé de la cellule.

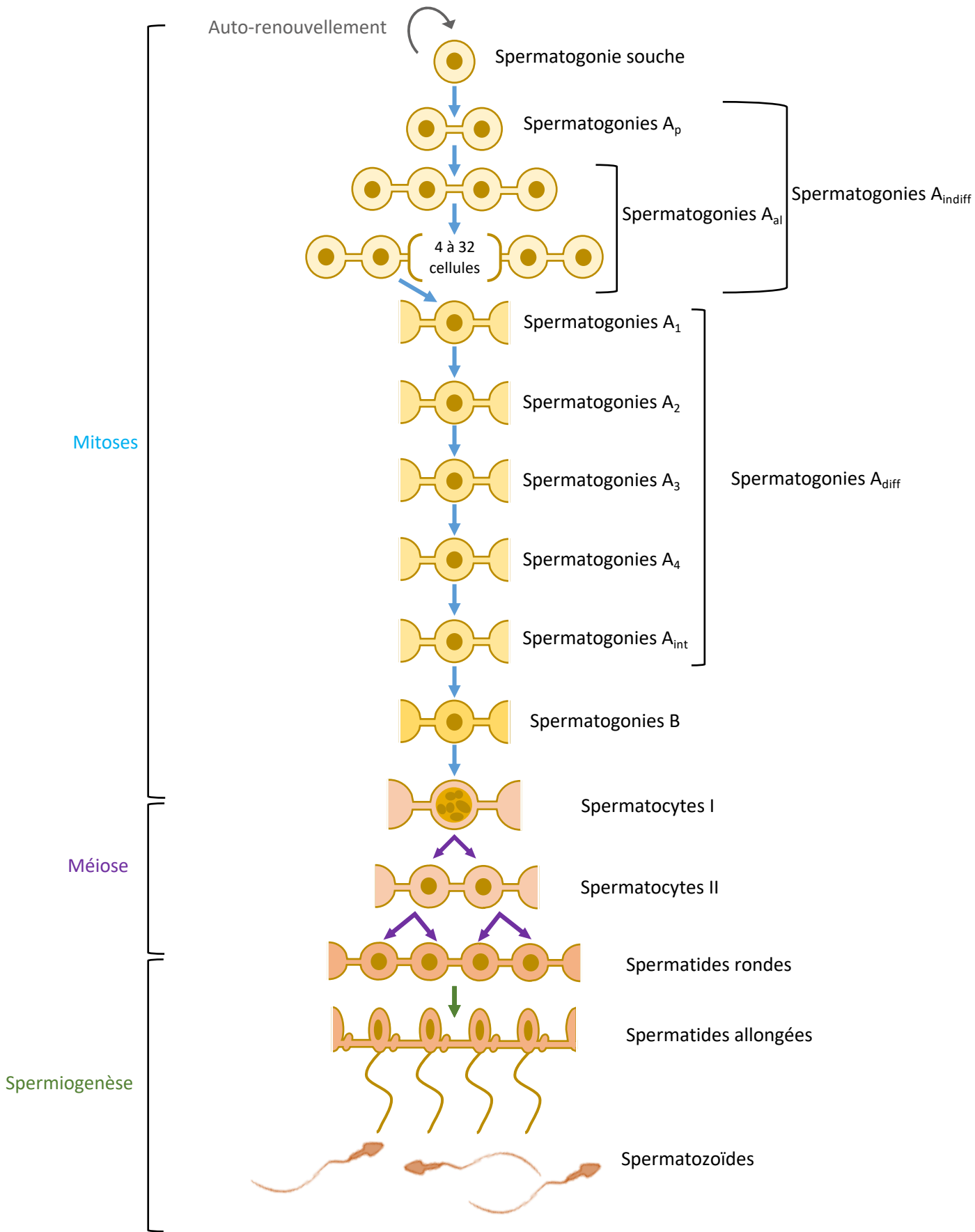


Figure 13 : Schéma de la spermatogénèse.

- Télophase : la cellule réalise la cytokinèse qui permet l'individualisation de deux nouvelles cellules filles.

La mitose permet de conserver un stock de spermatogonies souches constant dans le testicule. Les spermatogonies souches indifférenciées sont appelées les spermatogonies A indifférenciées (A_{indiff}). La moitié de ces cellules s'auto-renouvellent en réalisant des divisions mitotiques alors que l'autre moitié entre dans le processus de différenciation (de Rooij *et al.*, 1999).

Les spermatogonies A indifférenciées (A_{indiff}) sont les cellules les plus primitives des tubes séminifères du testicule adulte. Elles sont composées de trois groupes de cellules : les spermatogonies A_{single} (A_s), A_{paired} (A_p) et $A_{\text{alignée}}$ (A_{al}). Situées au niveau de la membrane basale du tube séminifère, les spermatogonies A_s réalisent des divisions mitotiques dès 4 *jpp* chez la souris pour donner les spermatogonies A_{pr} . Celles-ci se multiplient à leur tour pour donner naissance aux spermatogonies A_{al} . Les spermatogonies A_{pr} sont reliées par 2 alors que les spermatogonies A_{al} forment des chaînes de 4 à 32 cellules reliées par des ponts cytoplasmiques, conséquence d'une cytokinèse incomplète. Ces cellules souches A_{al} se différencient sans division mitotique en spermatogonies A_1 . Puis ces spermatogonies A_1 se divisent et forment successivement les spermatogonies A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , Intermédiaire (In) et B. Les spermatogonies A_1 à B sont nommées les spermatogonies ou A_{diff} (**Figure 13**). Les spermatogonies B se différencient en spermatoocytes I lorsqu'ils initient la méiose (De Rooij, 2001). Ces spermatogonies différenciées ont perdu leurs capacités de renouvellement. Ainsi, il existe un équilibre important entre les capacités d'autorenouvellement et de différenciation des spermatogonies A_{indiff} et plusieurs gènes jouent un rôle primordial dans ce phénomène (**Figure 15**).

Le facteur GDNF (pour *Glial cell line-derived neurotrophic factor*) produit par les cellules de Sertoli joue un rôle important dans l'auto-renouvellement des spermatogonies A_{indiff} après la naissance. GDNF se lie à un dimère composé du récepteur tyrosine kinase Ret et GFRA1 (pour GDNF family receptor- α 1), et présente sur la surface des spermatogonies indifférenciées. La signalisation dépendante de GDNF contrôle la balance de prolifération et de différenciation des spermatogonies indifférenciées (Meng *et al.*, 2000). La transplantation de testicules de 0 *jpp* de souris dépourvues de Gdnf, Gfra1 et Ret (délétions létales à la naissance sur des souris adultes WT) a permis de démontrer que les testicules mutants présentent un épuisement des spermatogonies A_{indiff} (effet observé 7 jours après la greffe) (Naughton *et al.*, 2006). À l'inverse, une surexpression de GDNF dans des testicules de souris entraîne une prolifération excessive des spermatogonies A_{indiff} (Meng *et al.*, 2000) et les souris sont stériles. Ces résultats mettent en évidence que la signalisation dépendante de GDNF et de ces récepteurs maintient l'état indifférencié des spermatogonies A_{indiff} et favorise ainsi leurs proliférations.

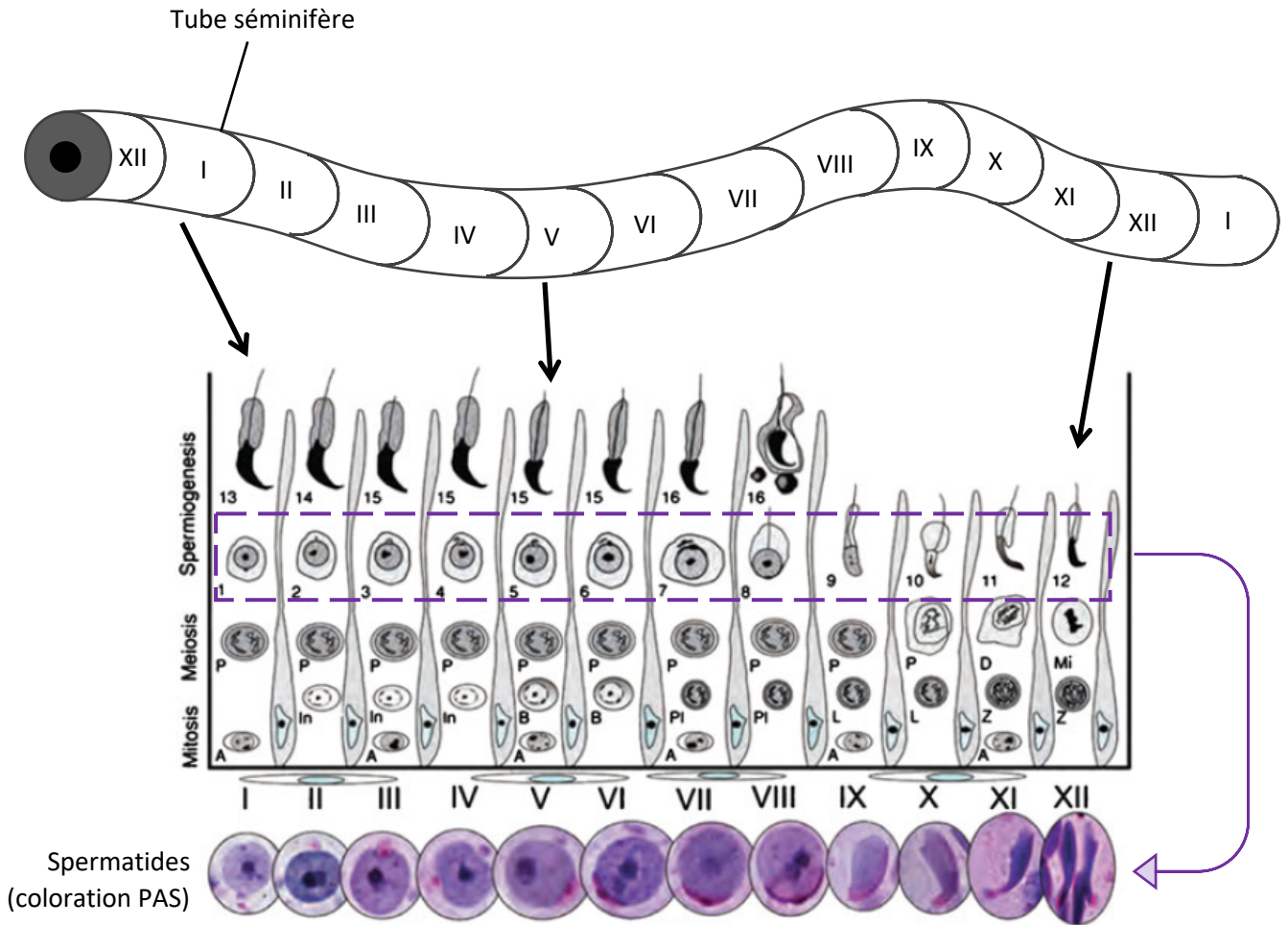


Figure 14 : Les stades de l'épithélium séminifère chez la souris.

Caractérisation histologique des 12 stades de l'épithélium séminifère chez la souris. La morphologie des spermatides colorés en PAS permet de différencier les stades de l'épithélium séminifère suivant la morphologie cellulaire et la forme de l'acrosome (mis en évidence en couleur rose).

Adapté de Meistrich et Hess, 2013

Ngn3 (pour *Neurogenin 3*) est exprimé dans les spermatogonies A_s , A_{pr} et A_{al} (A_{indiff}) juste après la naissance chez la souris. Son expression augmente fortement jusqu'à 7 *jpp* avant de diminuer progressivement (Yoshida *et al.*, 2004). Il a été mis en évidence que *Ngn3*, à l'inverse de la signalisation dépendante de GDNF, promeut la différenciation des spermatogonies A_{indiff} (Nakagawa *et al.*, 2007).

Nanos2 est exprimée dans les spermatogonies A_s et A_p (Sada *et al.*, 2009). Son invalidation conditionnelle chez des souris de 4 semaines entraîne un épuisement des spermatogonies indifférenciées (Sada *et al.*, 2009). A l'inverse, la surexpression de *Nanos2* dans le testicule adulte entraîne l'accumulation de spermatogonies indifférenciées et une forte diminution du nombre de spermatogonies différenciées (Sada *et al.*, 2009). Ainsi NANOS2 maintient l'état de pluripotence des spermatogonies A_s et A_p .

Un phénotype semblable de perte des cellules germinales indifférenciées dans le testicule adulte est observé dans une lignée de souris invalidées pour le gène *Zbtb16* (pour *zinc finger and BTB domain containing 16* aussi nommé Plzf pour promyelocytic leukemia zinc-finger) traduisant un rôle similaire à *Nanos2* (Costoya *et al.*, 2004). Par ailleurs, ZBTB16 dans les spermatogonies A_{indiff} réprime l'expression de c-Kit en se liant à son promoteur (Filipponi *et al.*, 2007). C'est seulement dans les spermatogonies A_{diff} que l'expression de c-Kit augmente (Schrans-Stassen *et al.*, 1999). c-Kit joue un rôle important dans la différenciation des spermatogonies A_{indiff} en spermatogonies A_{diff} . Un défaut de signalisation de *ckit* entraîne un arrêt de la spermatogenèse lors de la différenciation des spermatogonies A_{indiff} en spermatogonies A_{diff} .

L'acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A, semble également jouer un rôle dans la différenciation des spermatogonies. Les rats carencés en vitamine A ne produisent que des spermatogonies A_{indiff} dans les tubes séminifères traduisant l'incapacité de ces spermatogonies à se différencier en absence de Vitamine A et donc d'AR (van Pelt *et al.*, 1995). Cette absence d'AR bloquerait la différenciation des spermatogonies A_{indiff} . De plus, l'injection de rétinoïdes chez les rats carencés en vitamine A induit la transition des spermatogonies A_{indiff} en spermatogonies A_{diff} et la reprise de la spermatogenèse dans la majorité des tubes séminifères (van Pelt and de Rooij, 1991; van Pelt *et al.*, 1995). Les souris mâles dépourvues, dans les cellules de Sertoli à partir de 15 *jpc*, des gènes *Aldh* (*aldehyde dehydrogenase*, enzymes permettant la synthèse de l'AR: *Aldh1a1*, 2 et 3) présentent une absence de différenciation des spermatogonies A_{indiff} . Puis, l'injection d'AR entraîne la différenciation des spermatogonies A_{al} en spermatogonies A_1 (Raverdeau *et al.*, 2012). Ces résultats montrent que l'AR produit par les ALDH (nommées aussi *raldh*) dans les cellules de Sertoli permet la différenciation des spermatogonies A_{indiff} . L'acide rétinoïque agirait également directement sur les

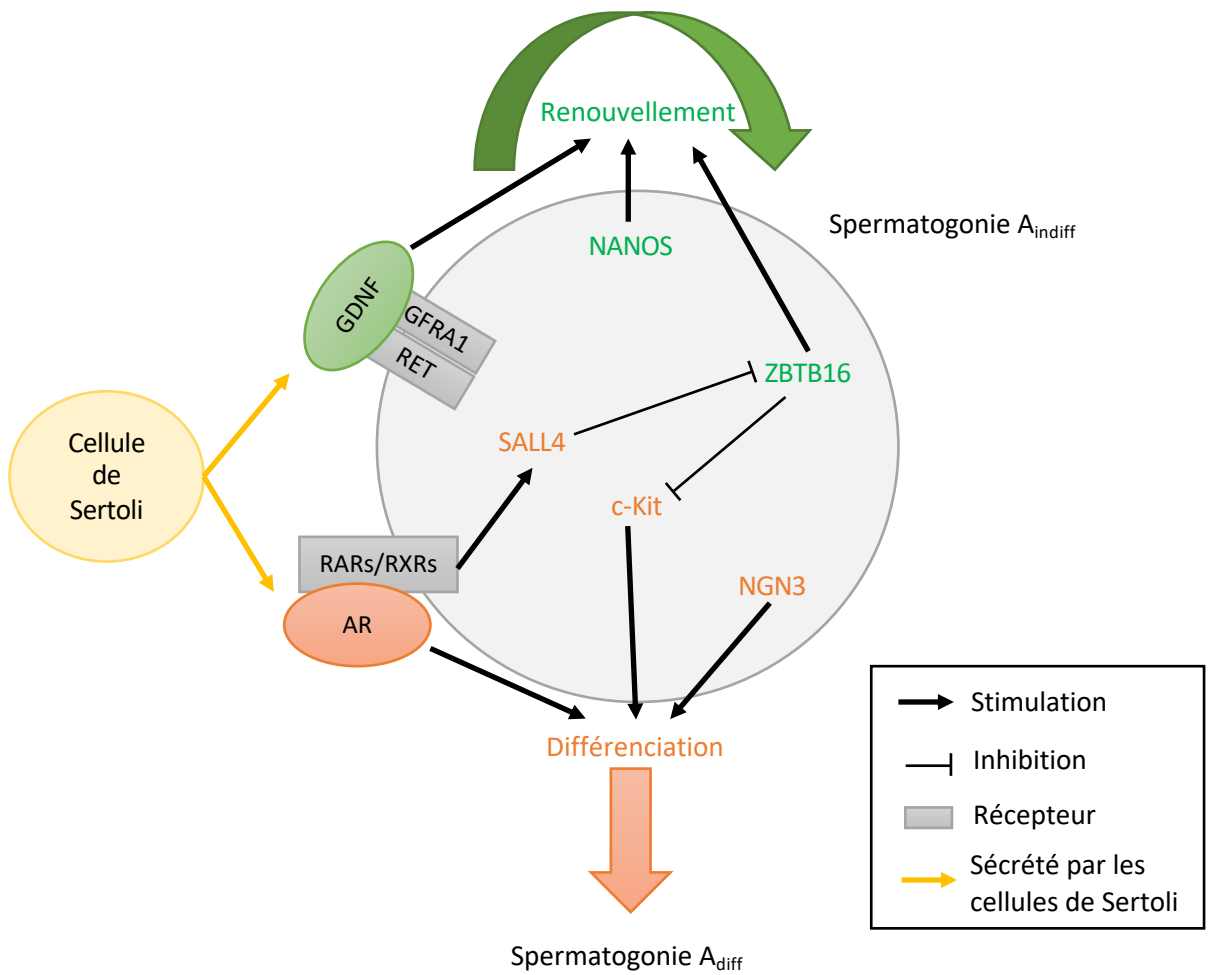


Figure 15 : Schéma des facteurs impliqués dans la balance entre le renouvellement et la différenciation des cellules souches spermatogoniales.

Les spermatogonies souches sont soumises à différents signaux favorisant le renouvellement des spermatogonies indifférenciées (facteurs en vert) ou leurs différenciations (facteurs en orange).

spermatogonies A_{indiff} via ses récepteurs (RAR) puisque l'invalidation des $RAR\alpha$ et $RAR\gamma$ entraîne un défaut de différenciation des spermatogonies A_{indiff} (Gely-Pernot *et al.*, 2012; Mark *et al.*, 2015).

Il a été mis en évidence que l'expression de l'acide rétinoïque induit l'expression de *Sall4* (pour *spalt like transcription factor 4*). Cette protéine séquestre le facteur ZBTB16 qui n'est plus lié au promoteur de *c-kit*. *C-kit* est alors exprimé dans les spermatogonies et permet leur différenciation en spermatogonie A_{diff} (Hobbs *et al.*, 2012).

Ainsi les spermatogonies A assurent le renouvellement du stock de cellules souches indispensable pour la fertilité de l'individu. Les différents signaux décrit précédemment doivent s'équilibrer pour maintenir une balance entre la population de cellules souches A_{indiff} (GDNF, ZBTB16, NANOS2) et la population A_{indiff} qui entre en différenciation (*c-Kit*, NGN3, AR) (**Figure 15**). Le stock de cellules souches A_{indiff} reste constant par autorenouveau mitotique. La première différenciation des spermatogonies A en B a lieu vers 9 *jpp* chez la souris. Les spermatogonies B présentent des amas de chromatine condensée dans le noyau le long de la membrane nucléaire. Les spermatogonies se divisent enfin pour donner les spermatocytes I, à l'hétérochromatine moins dense que dans les spermatogonies B (Bellvé *et al.*, 1977). Ces spermatocytes I vont alors initiée la méiose.

Chez l'homme il n'est observé que deux types de spermatogonies A considérées comme des cellules souches indifférenciées: les spermatogonies A_{dark} (A_d) ou A_{pale} (A_p) (Dym *et al.*, 2009). Les spermatogonies A_d présentent un noyau sombre avec des vacuoles nucléaires et se différencient en spermatogonies A_p , noyau pâle sans vacuole nucléaire. Puis les spermatogonies A_p se différencient en spermatogonies B puis en spermatocytes (Dym *et al.*, 2009).

2. La méiose

La méiose est une étape clé de la spermatogenèse. Les spermatocytes I diploïdes réalisent au préalable une duplication de leur matériel génétique. Puis, ces spermatocytes $4n$ réalisent deux divisions successives aboutissant à la formation de cellules haploïdes (n chromosome). Ainsi une cellule $4n$ donne naissance à quatre cellules haploïdes après la méiose.

Chacune des deux divisions de méiose est divisée en quatre étapes comme pour la mitose : prophase, métaphase, anaphase et télophase. Durant la première division méiotique, la prophase I est divisée également en cinq étapes : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacynèse en fonction des changements de la morphologie des chromosomes (**Figure 16**). A la différence de la mitose, la première division de méiose permet la ségrégation des chromosomes puis la deuxième division permet la séparation des chromatides sœurs dans chaque cellule fille, on parle donc de division réductionnelle puis de division équationnelle pour la méiose.

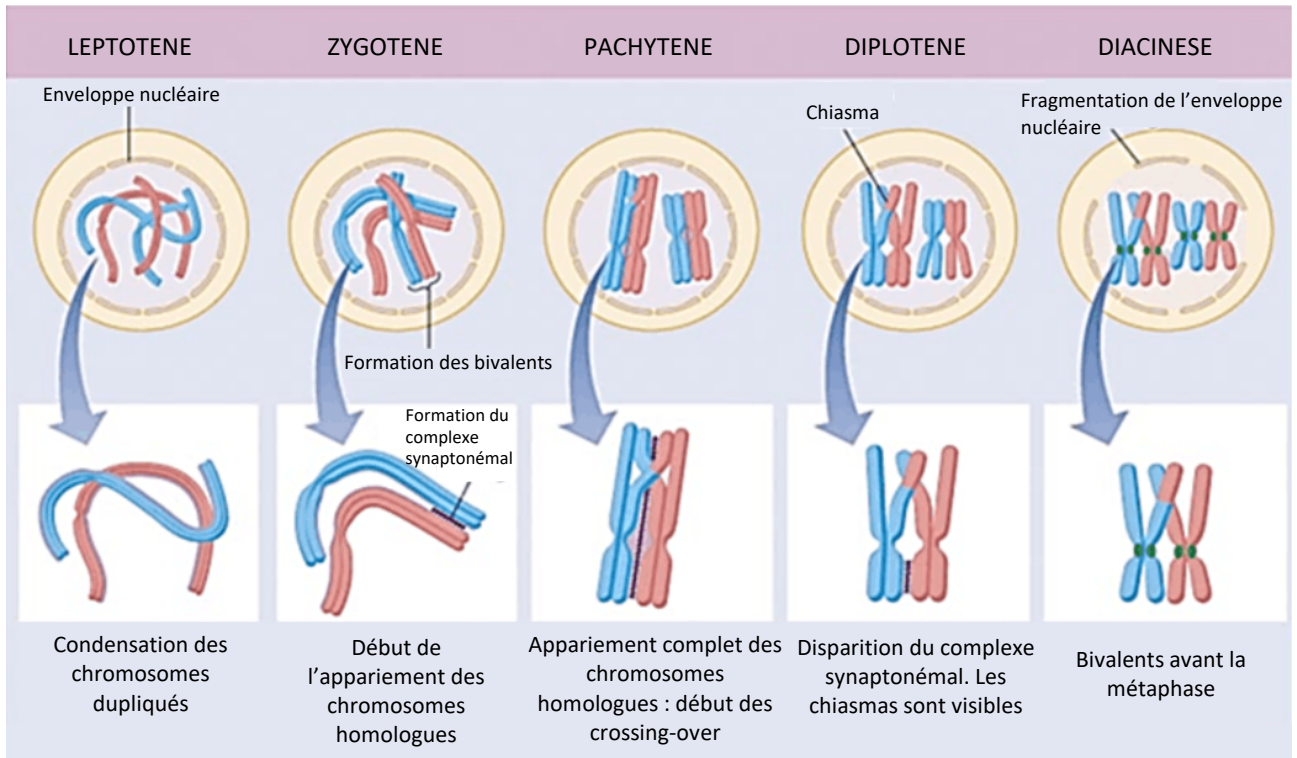


Figure 16: Schéma des étapes de prophase I.

Issue de <https://www.flexiprep.com/NIOS-Notes/Senior-Secondary/Biology/NIOS-Biology-Ch-4-Cell-Structure-and-Function-Part-12.html>

Les gènes régulant la méiose ont été très étudiés chez la levure étant donné la simplicité de ce modèle. L'étude des gènes de méiose chez les mammifères se révèle plus complexe. Néanmoins le développement de lignées mutantes de souris/rat et l'étude de mutations naturelles chez des patients infertiles a permis de mettre en lumière les principaux acteurs de la méiose chez les mammifères.

a. Première division méiotique

La première division de méiose est réductionnelle. Elle permet de séparer les chromosomes homologues et réduit le nombre de chromosomes de 4 à $2n$. La phase leptotène de méiose I est précédée par la phase pré-leptotène qui dure environ 42 heures chez la souris avec la réplication de l'ADN. L'entrée des cellules en leptotène de prophase I marque l'entrée des cellules germinales dans le processus de méiose.

Stra8 est exprimé dans les spermatogonies A_{diff} avec un pic d'expression vers 10jpp, lors de l'entrée en méiose des cellules germinales (Zhou *et al.*, 2008). *Stra8* est nécessaire pour l'initiation de la méiose pendant la vie embryonnaire chez la femelle et après la naissance chez les mâles. Les souris invalidées pour le gène *Stra8* sont infertiles dans les deux sexes. Chez les mâles, les cellules germinales sont bloquées au stade pré-leptotène, juste avant l'initiation de la méiose, et entrent en apoptose (Anderson *et al.*, 2008). Des expériences d'immunohistochimie révèlent l'absence de mise en place des protéines spécifiques de méiose telles que SYCP3 et REC8 à 15 jpp (Anderson *et al.*, 2008). Ainsi, l'expression de *Stra8* dans les spermatocytes est nécessaire pour la transition de la phase pré-leptotène à la phase leptotène de la première division de méiose.

Comme son nom l'indique, *Stra8* (stimulated by retinoic acid gene 8) voit son expression stimulée par l'AR. Alors que l'AR, métabolite actif de la vitamine A, joue un rôle essentiel dans la différenciation des spermatogonies, depuis plus de 15 ans, les recherches se sont multipliées pour savoir si l'AR est impliqué dans l'initiation de la méiose (mâle ou femelle).

Brièvement, dans le testicule murin, il a été mis en évidence que l'AR serait nécessaire pour l'initiation de la méiose en activant l'expression de *Stra8*. Les souris $Aldh1a1-3^{Ser-/-}$ (mutation de tous les gènes *Aldh1a* dans les cellules de Sertoli) présentent un arrêt de la spermatogénèse : les spermatocytes sont bloqués au stade A_{al} (A_{indiff}) (Raverdeau *et al.*, 2012). L'injection d'AR chez ces mâles mutants permet la reprise de la différenciation des spermatogonies A, avec l'observation de spermatogonies B (6 jours après l'injection d'AR), puis des spermatocytes au stade leptotène (7 jours après l'injection d'AR). Ces spermatocytes expriment alors les marqueurs de méiose tels que STRA8 et REC8 (Raverdeau *et al.*, 2012). Pour vérifier que l'AR est bien responsable de l'initiation de la méiose 6 jours après l'injection d'AR, un agoniste inverse de l'AR (pan-RAR BMS493 qui empêche l'action de l'AR en se fixant sur ces récepteurs) a été injecté 6 jours après l'injection d'AR. Cette injection altère la

formation des spermatocytes pré-leptotènes et inhibe l'expression de STRA8 et l'initiation de la méiose : ce phénotype ressemble à celui des souris *Stra8*^{-/-}. Si de l'AR est injecté en même temps que l'agoniste inverse, il n'y a pas d'inhibition de la méiose (Raverdeau *et al.*, 2012). Ainsi ces résultats tendent à démontrer que l'AR serait responsable de l'initiation de la méiose mâle en stimulant l'expression de *Stra8*. Plus récemment, afin de comprendre le rôle de l'AR pour la spermatogenèse, des lignées de souris mutantes dépourvues de toutes activités ALDH dans les cellules germinales et/ou dans les cellules de Sertoli ont été générées (Teletin *et al.*, 2019). L'injection d'AR dans les testicules dépourvus de tous les RALDH de l'épithélium séminifère (souris *Aldh1a1-3*^{Germ^{-/-}; Ser^{-/-}}), entraîne une initiation de la méiose dans les cellules germinales. L'initiation de la méiose est retardée de 24h par rapport aux contrôles, mais l'expression de *Stra8* est comparable aux mâles WT entraînant la transition des spermatocytes vers le stade pachytène (Teletin *et al.*, 2019). Ces résultats indiquent que l'AR, indispensable à la différenciation des spermatogonies, n'est pas nécessaire pour l'initiation de la méiose mâle.

i. Leptotène :

Au cours du stade leptotène, les chromosomes se condensent, s'individualisent et le noyau augmente en volume. Le complexe synaptonémal commence à se déployer entre les chromosomes homologues. Ce complexe sera complètement formé au stade pachytène. Le complexe synaptonémal est une structure protéique spécifique de la méiose qui permet l'appariement des chromosomes homologues. Ce complexe de protéines est composé des 2 éléments axiaux SYCP2 (pour *synaptonemal complex protein 2*) et SYCP3 ainsi que de l'élément central SYCP1 (**Figure 17**). Les éléments axiaux se localisent le long des chromatides sœurs des homologues. Puis l'élément central permet l'assemblage des éléments axiaux par polymérisation et agit comme une « fermeture éclair ».

Des cohésines sont également essentielles pour la mise en place correcte du complexe synaptonémal. Les complexes de cohésines sont composés de protéines exprimées de façon ubiquitaire (SMC1 α , SMC3, RAD21, STAG1/SA1 et STAG2/SA2) retrouvées en mitose et méiose, ainsi que des protéines spécifiques de la méiose (SMC1 β , RAD21L, REC8 and STAG3/SA3). Durant la mitose, les cohésines maintiennent les chromatides sœurs appariées. Pendant la méiose, en plus de maintenir les chromatides sœurs, les chromosomes homologues doivent être appariés grâce aux cohésines spécifiques du complexe synaptonémal.

Les cohésines spécifiques REC8 et SMC1 β sont détectées par immunohistochimie sur les chromosomes respectivement à partir du stade pré-leptotène et leptotène. Ainsi, REC8 forme des structures qui ressemblent aux éléments axiaux, puis SMC1 β se colocalise avec REC8, SYCP2 et SYCP3 (Eijpe *et al.*, 2003). Ainsi, les cohésines REC8 et SMC1 β pourraient fournir une base pour la formation des éléments axiaux. Les souris invalidées pour la cohésine *Smc1 β* ou *Rec8* sont stériles dans les deux

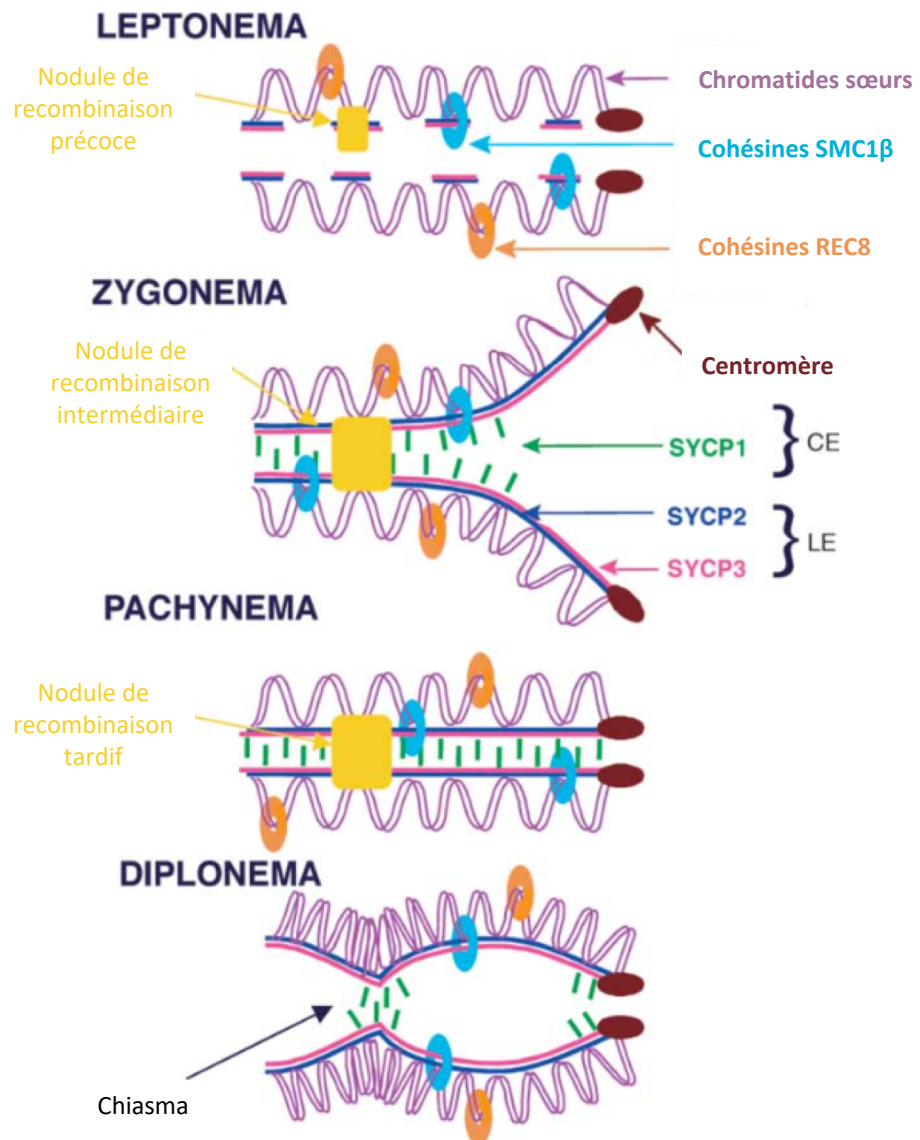


Figure 17 : Formation du complexe synaptonémal chez la souris.

Le complexe synaptonémal est initié au stade leptotène avec les éléments axiaux SYCP2 et SYCP3. Puis au stade zygotène, le complexe synaptonémal se forme et permet l'appariement des chromosomes homologues sur toute leur longueur. Au stade pachytène, il est complètement formé. Puis le complexe synaptonémal se dissocie mais les chromosomes homologues restent en contact seulement au niveau des chiasmata.

Au stade leptotène, les nodules méiotiques précoces commencent à s'accumuler. La composition des nodules méiotiques change au cours de la méiose pour laisser place aux nodules méiotiques intermédiaires au stade zygotène puis tardif au stade pachytène. Au stade diplotène, les nodules disparaissent et seuls les chiasmata sont visibles. Les protéines du complexe de cohésines REC8 et SMC1 β sont localisées respectivement au niveau des boucles de chromatine et de l'axe des chromosomes en prophase I.

CE : élément central ; LE : élément latéral.

Issue de Morelli et Cohen, 2005.

sexes avec un arrêt au cours de la première division de méiose (Bannister *et al.*, 2004; Revenkova *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005). La méiose I des souris mâles *Smc1 β ^{-/-}* est bloquée au stade pachytène : les spermatocytes I présentent des éléments axiaux raccourcis et une formation incomplète du complexe synaptonémal qui résulte en une perte prématurée de la cohésion des chromatides sœurs (Revenkova *et al.*, 2004). En absence de *Rec8*, si les premières étapes de la mise en place du complexe synaptonémal semblent normales, c'est au moment de l'appariement des chromosomes que des anomalies sont observées. En effet, l'appariement des chromosomes se fait entre les chromatides sœurs et non entre les chromosomes homologues. Ces résultats suggèrent que les cohésines REC8 et SMC1 β , actives dès le stade leptotène, ont des rôles distincts dans la mise en place du complexe synaptonémal. SMC1 β est nécessaire pour la formation correcte des éléments axiaux du complexe synaptonémal alors que REC8 joue un rôle dans la reconnaissance des chromosomes homologues pour la formation du complexe synaptonémal.

La mutation de *Rad21L* chez la souris entraîne une infertilité chez le mâle. Les femelles, d'abord fertiles, deviennent infertiles en vieillissant. La protéine RAD21L est observée dans les spermatocytes dès le stade leptotène et colocalise avec la protéine SYCP3 au niveau des éléments axiaux en cours d'élongation. Les spermatocytes *Rad21L^{-/-}* présentent des défauts dans l'initiation de l'appariement des chromosomes qui mènent à un blocage des spermatocytes au stade zygotène (Herrán *et al.*, 2011). Rad21L est primordiale pour l'initiation de l'appariement des chromosomes.

L'inactivation de STAG3 entraîne le phénotype le plus sévère observé parmi les lignées de souris invalidés pour une cohésine spécifique de la méiose. Les souris *Stag3^{-/-}* sont stériles. Chez le mâle, les spermatocytes, bloqués au stade leptotène, échouent dans la mise en place des éléments axiaux et présentent des défauts dans la cohésion des centromères des chromatides sœurs (Hopkins *et al.*, 2014; Winters *et al.*, 2014). Ainsi, STAG3 est essentiel pour la mise en place des éléments axiaux du complexe synaptonémal.

L'intégrité du complexe de cohésines spécifique de la méiose est donc essentiel pour assurer la formation du complexe synaptonémal et l'appariement correcte des chromosomes homologues des stades de prophase I ultérieurs.

Durant la phase de leptotène, les chromosomes se condensent. De façon concomitante à l'appariement initial des chromosomes homologues, les télomères se réorganisent en s'accrochant au niveau de l'enveloppe nucléaire interne. Ces télomères s'organisent en clusters dans une région réduite de l'enveloppe nucléaire. Cette configuration des télomères est appelée le stade de « bouquet ». Elle est observable en immunofluorescence dès la transition leptotène/zygotène chez l'homme et la souris (Alleva and Smolikove, 2017). Le complexe ubiquitaire LINC (pour Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) relie les télomères à la membrane nucléaire. Cet accrochage

permet un regroupement transitoire des télomères, ce qui facilite l'appariement des chromosomes homologues (ou synapse) (Horn *et al.*, 2013). Chez la souris, le complexe LINC est composé de deux types de protéines : la protéine SUN1 qui se situe au niveau de l'enveloppe nucléaire interne et la protéine KASH5, spécifique de la méiose, située au niveau de la membrane nucléaire externe (Ding *et al.*, 2007; Morimoto *et al.*, 2012) (**Figure 18**). Les souris invalidées pour le gène *Sun1* sont infertiles dans les deux sexes. Les mâles présentent une accumulation de "spermatocytes-like" anormaux bloqués en prophase I et qui dégèrent par apoptose. SUN1 est nécessaire pour l'accrochage des télomères à la membrane nucléaire. En son absence, les télomères ne s'accrochent pas à la membrane nucléaire et l'appariement des chromosomes homologues est altéré (Ding *et al.*, 2007). Un phénotype similaire est observé chez les souris invalidées pour KASH5 (Horn *et al.*, 2013). KASH5 s'associe à la fois à SUN1 et au cytosquelette par l'intermédiaire de dynéines (Horn *et al.*, 2013; Morimoto *et al.*, 2012). Ainsi, les télomères sont reliés à la membrane nucléaire par KASH5 via des dynéines, elles-mêmes accrochées aux microtubules du cytosquelette du cytoplasme des spermatocytes I. En plus des éléments nucléaires, des éléments cytoplasmiques sont donc indispensables pour l'appariement des chromosomes homologues.

Toujours au stade leptotène, des cassures doubles-brins (ou DSB pour *double-strand breaks*) de l'ADN sont initiées par la protéine SPO11 (pour *SPO11 initiator of meiotic double stranded breaks*). SPO11 est une topoisomérase hautement conservée, et initialement découverte chez la levure. Son site actif contenant une tyrosine permet la liaison à l'ADN entraînant une cassure double-brin. L'invalidation de Spo11 chez la souris entraîne une infertilité dans les deux sexes. Chez les mutants mâles, la méiose est bloquée au stade zygotène et les spermatocytes dégèrent par apoptose (Baudat *et al.*, 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000). Les spermatocytes *Spo11*^{-/-} n'ont pas de DSB et la formation du complexe synaptonémal n'a pas lieu. Ainsi, ces résultats laissent supposer que la formation des DSB favorisent l'appariement des chromosomes homologues.

Au niveau des cassures doubles-brins se forment des nodules spécifiques de la méiose. Au stade leptotène, on parle de nodules méiotiques précoces (*early nodules*). Ces nodules, composés de différentes protéines, évoluent au cours de la prophase I en composition et en nombre (*intermediate nodules* en zygotène, *late nodules* en pachytène) pour aboutir dans certains cas à des crossing-overs entre les chromosomes homologues.

Les DSB ne se font pas de manière aléatoire le long des chromosomes mais au niveau de zones appelées les « hotspots »: ce sont des zones enrichies en H3K4me3 (triméthylation de la Lysine 4 de l'histone H3) et H3K36me3 (triméthylation de la Lysine 36 de l'histone H3) (Powers *et al.*, 2016). L'histone méthyl transférase PRDM9 (pour *PR domain containing 9*) est essentielle pour la localisation

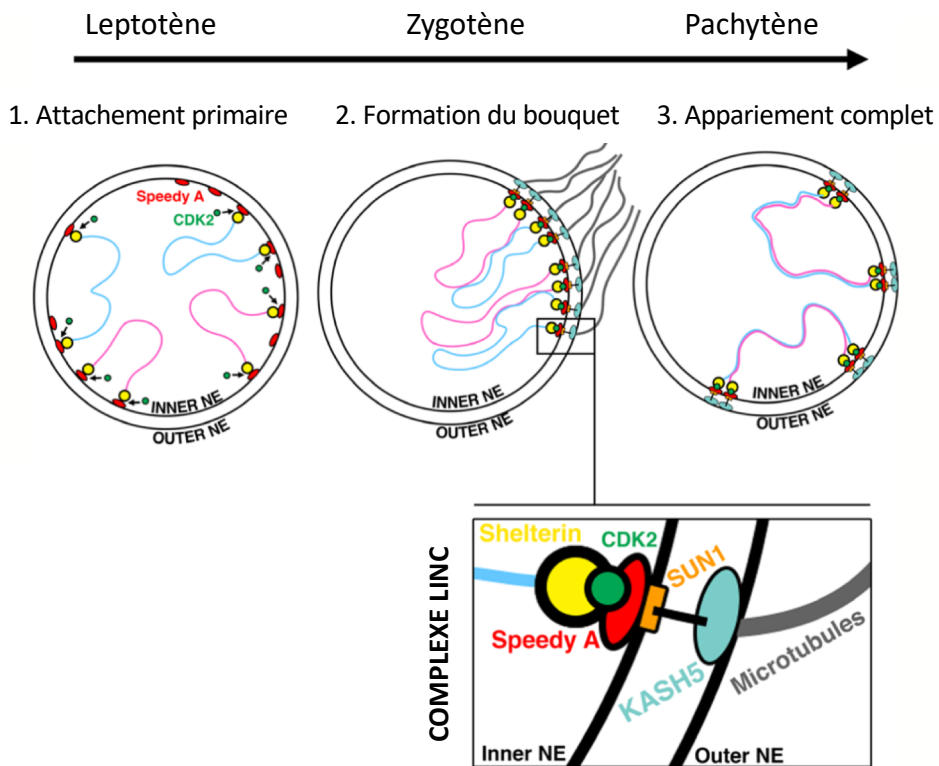


Figure 18 : Le complexe LIN/ le bouquet.

(1) Durant la phase de leptotène, les télomères des chromosomes présentent un attachement primaire à la membrane nucléaire interne. Les chromosomes paternels dupliqués sont représentés par les lignes bleues et les chromosomes maternels dupliqués par les lignes roses. (2) Au stade pachytène, l’organisation des chromosomes forme le bouquet. Le complexe LINC est complètement formé. Les protéines qui composent ce complexe sont Shelterin, CDK2, SpeedyA, SUN1 et KASH5. (3) La formation du bouquet permet le rapprochement des paires de chromosomes homologues et facilite l’appariement des chromosomes homologues observé au stade pachytène.

Inner NE : Membrane nucléaire interne ; Outer NE : Membrane nucléaire externe.

Adaptée de Palmer *et al.*, 2020.

de ces « hot spots » sur le génome (Powers *et al.*, 2016). Les souris PRDM9^{-/-} sont infertiles, elles réalisent des DSB de façon aléatoire qui ne seront pas réparés, entraînant un arrêt de la méiose au stade pachytène (Brick *et al.*, 2012). PRMD9 permet de guider SPO11 au niveau des « hotspots », là, SPO11 génère des DSB. PRMD9 jouerait également un rôle dans la réparation des DSB.

Ainsi à la fin du stade leptotène, les chromosomes sont organisés en « bouquet » et le complexe synaptonémal commence à se mettre en place le long des chromosomes homologues.

ii. Zygotène :

Le stade zygotène est caractérisé par la mise en place de l'élément central du complexe synaptonémal qui se forme en différents points sur les chromosomes pour former les synapses. Chez les mammifères, SYCP1 se localise au niveau de cet élément central du complexe synaptonémal entre les éléments axiaux. Ces derniers sont alors appelés élément latéraux où sont localisés SYCP2 et SYCP3 (**Figure 17**). Ces protéines se connectent entre elles grâce aux filaments transversaux.

L'invalidation de SYCP3 chez la souris entraîne une infertilité chez le mâle avec un blocage des spermatocytes au stade zygotène (Yuan *et al.*, 2000). Le complexe synaptonémal ne se forme pas dans ces spermatocytes mutants, ces cellules ne progressent pas au-delà du stade zygotène et dégénèrent par apoptose. Une mutation dans le domaine conservé coiled-coiled du gène *Sycp2* entraîne une infertilité mâle où les spermatocytes sont bloqués au stade zygotène (Yang *et al.*, 2006). Les auteurs ont montré que SYCP2 guide SYCP3 au niveau des éléments latéraux du complexe synaptonémal grâce à son domaine coiled-coiled (Yang *et al.*, 2006). Chez les femelles, l'invalidation de SYCP2 ou SYCP3 génère des souris subfertiles pointant un aspect du dimorphisme sexuel pour le rôle des protéines du complexe synaptonémal méiotique (Yang *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2000). Les ovocytes SYCP3^{-/-} sont fertiles mais présentent un taux élevé de cellules aneuploïdes dans les ovaires (Yuan *et al.*, 2002).

L'invalidation de SYCP1 chez la souris entraîne une infertilité dans les deux sexes (de Vries, 2005). Lors de la mise en place des éléments axiaux dans les spermatocytes *Sycp1*^{-/-}, aucun appariement des chromosomes n'est observé ce qui impacte la réparation des DSBs, la formation des crossing-overs dans les deux sexes et la formation du XY body chez le mâle. Chez les mammifères, la protéine SYCP1 est associée à d'autres protéines de l'élément central nommées SYCE1 (pour *synaptonemal complex central element 1*), SYCE2, SYCE3 et TEX12 (pour *testis expressed sequence 12*). Il a été mis en évidence que SYCE2 et TEX12 s'associent spontanément en hétéro-octamère pour interagir avec SYCE1 et SYCP1 et former les structures filamenteuses du complexe synaptonémal (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006). La formation de l'élément central du complexe synaptonémal est indispensable pour les recombinaisons de l'ADN. En effet, l'invalidation d'un des éléments centraux empêche la maturation des crossing-overs (Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009; Hamer *et al.*, 2006;

Schramm *et al.*, 2011; de Vries *et al.*, 2005). Par exemple, les souris mâles et femelles invalidées pour SYCE2 ou SYCE1 sont infertiles et présentent des défauts dans l'assemblage du complexe synaptonémal. Chez ces souris mutantes, aucune synapse et réparation des cassures double-brin ne sont observées (Bolcun-Filas *et al.*, 2007, 2009). Chez l'homme, l'échec de formation du complexe synaptonémal entraîne des infertilités masculines (Judis *et al.*, 2004).

Ainsi, le rôle des protéines du complexe synaptonémal suggère un lien étroit avec les recombinaisons précoces des chromosomes homologues. Celles-ci sont initiées dans un premier temps par les cassures doubles-brins formées au stade leptotène (décrit précédemment). Une fois les DSB créés par SPO11, cette protéine se dissocie du site de coupure. Les recombinases RAD51 (pour *RAD51 recombinase*) et DMC1 (pour *disrupted meiotic cDNA*) reconnaissent les DSB de l'ADN et s'y fixent. Chez la souris, *Rad51* est exprimé dans les cellules en mitose et en méiose alors que *Dmc1* est spécifique de la méiose (Bishop *et al.*, 1992; Habu *et al.*, 1996). Les souris *Spo11*^{-/-} ne présentent pas de foyer RAD51-DMC1 détectable puisque les DSB ne se forment pas (Romanienko and Camerini-Otero, 2000). Chez les mammifères, les foyers RAD51-DMC1 participent à la formation des nodules méiotiques précoces (Plug *et al.*, 1998). Ils initient la recombinaison inter-homologue et la réparation des cassures (Tarsounas *et al.*, 1999). L'inactivation de RAD51 est létale durant l'embryogenèse précoce chez la souris (Tsuzuki *et al.*, 1996). L'absence de *Dmc1* chez la levure entraîne un défaut de formation du complexe synaptonémal sur toute la longueur des chromosomes (Bishop *et al.*, 1992). Les souris *Dmc1*^{-/-} sont infertiles dans les deux sexes (Pittman *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998) et les spermatocytes *Dmc1*^{-/-} sont bloqués au stade zygotène/début pachytène de méiose I puis dégénèrent par apoptose. Dans ces cellules, il n'y a pas d'initiation de la formation des synapses. En effet, malgré une transcription de *Sycp1* dans les spermatocytes *Dmc1*^{-/-}, la protéine SYCP1 n'est pas observée (Pittman *et al.*, 1998). Ainsi l'absence de *Dmc1* dans les spermatocytes entraîne un échec de la formation du complexe synaptonémal. Ces observations soulignent l'interdépendance du complexe synaptonémal avec la formation des nodules.

Le maintien des foyers DMC1-RAD51 au cours du stade zygotène dépend de la protéine MEIOB (pour *meiosis specific with OB domain*). Cette protéine conservée chez les vertébrés contient des sites de liaison à l'ADN et s'exprime spécifiquement dans les cellules germinales en début de méiose (Souquet *et al.*, 2013). Des immunofluorescences sur étalements chromosomiques de spermatocytes ont mis en évidence que MEIOB présente un marquage ponctiforme localisé le long de l'axe des chromosomes (colocalise avec SYCP3), visible du stade leptotène au stade pachytène (Souquet *et al.*, 2013). Les souris mâles et femelles invalidées pour *Meiob* sont stériles et présentent un arrêt de la méiose au stade zygotène/pachytène. Les cellules germinales *Meiob*^{-/-} présentent une absence de réparation des DSB et des défauts d'appariement des chromosomes. Les foyers DMC1-RAD51 sont

diminués de 70% dans les spermatocytes *Meiob*^{-/-} au stade zygotène par rapport au spermatocytes normaux. Ces observations confirment le rôle de MEIOB dans le maintien des foyers DMC1-RAD51 ainsi que dans la formation des recombinaisons homologues pendant la méiose.

Les nodules précoces deviennent des nodules intermédiaires (ou nodules transformés) au cours du stade zygotène : les foyers de protéines RAD51-DMC1 sont perdus lors de l'appariement des chromosomes homologues mais sont remplacés par des foyers composés en partie des protéines MSH4 (pour *mutS homolog 4*), MSH5 et BLM (pour *Bloom syndrome, RecQ like helicase*) (Moens *et al.*, 2002, 2007). Ces protéines vont intervenir pour une réparation efficace des cassures doubles-brins. Ces cassures seront réparées selon deux procédures: (i) une élongation de l'ADN simple-brin permettant une réparation « classique » de l'ADN ou (ii) au niveau d'autres cassures, apparaissent la formation des doubles jonctions de Holliday qui permettront la formation des crossing-overs visibles au stade pachytène (**Figure 19**). L'étude des gènes *Msh4* et *Msh5* par suppression génique chez la souris a mis en évidence leur rôle primordial dès le stade zygotène. Les souris *Msh4*^{-/-} ou *Msh5*^{-/-} mâles et femelles sont stériles. Dans ces deux lignées, les spermatocytes sont bloqués au stade zygotène avec un défaut d'appariement du complexe synaptonémal aux synapses anormales (Kneitz *et al.*, 2000; de Vries *et al.*, 1999). MSH4 et MSH5 se positionnent au niveau des nodules intermédiaires. La protéine TEX11 (pour *Testis expressed 11* ou ZIP4H) entre également dans la composition des nodules méiotiques intermédiaires puisqu'elle colocalise avec les foyers MSH4. Codée par le chromosome X, la protéine TEX11 en interaction avec SYCP2 est localisée au niveau des régions appariées dès le stade zygotène. Les souris mâles *TEX11*^{-Y} sont stériles et présentent des chromosomes non appariés (Yang *et al.*, 2008) ainsi que des anomalies de réparation des DSB (Adelman and Petrini, 2008). Ces anomalies entraînent des défauts de mise en place des crossing-overs et déclenchent une apoptose des spermatocytes au stade pachytène (Yang *et al.*, 2008). TEX 11 joue donc également un rôle dans la formation des synapses et des recombinaisons méiotiques chez les mâles.

iii. Pachytène :

Le stade pachytène est le stade de prophase I le plus long chez les mammifères (5 à 6 jours chez la souris), il est donc subdivisé en 3 étapes : précoce, intermédiaire et tardive. Les spermatocytes en pachytène ont un noyau de grande taille qui présente un aspect granuleux en microscopie optique. Les spermatocytes entrent en pachytène lorsque les chromosomes homologues sont complètement appariés. Les DSB sont réparés selon les systèmes de réparation énoncés dans le paragraphe précédent (**Figure 19**).

Les crossing-overs sont indispensables pour le bon déroulement de la méiose. Ils permettent l'échange d'information génétique entre les chromosomes homologues maternels et paternels et la

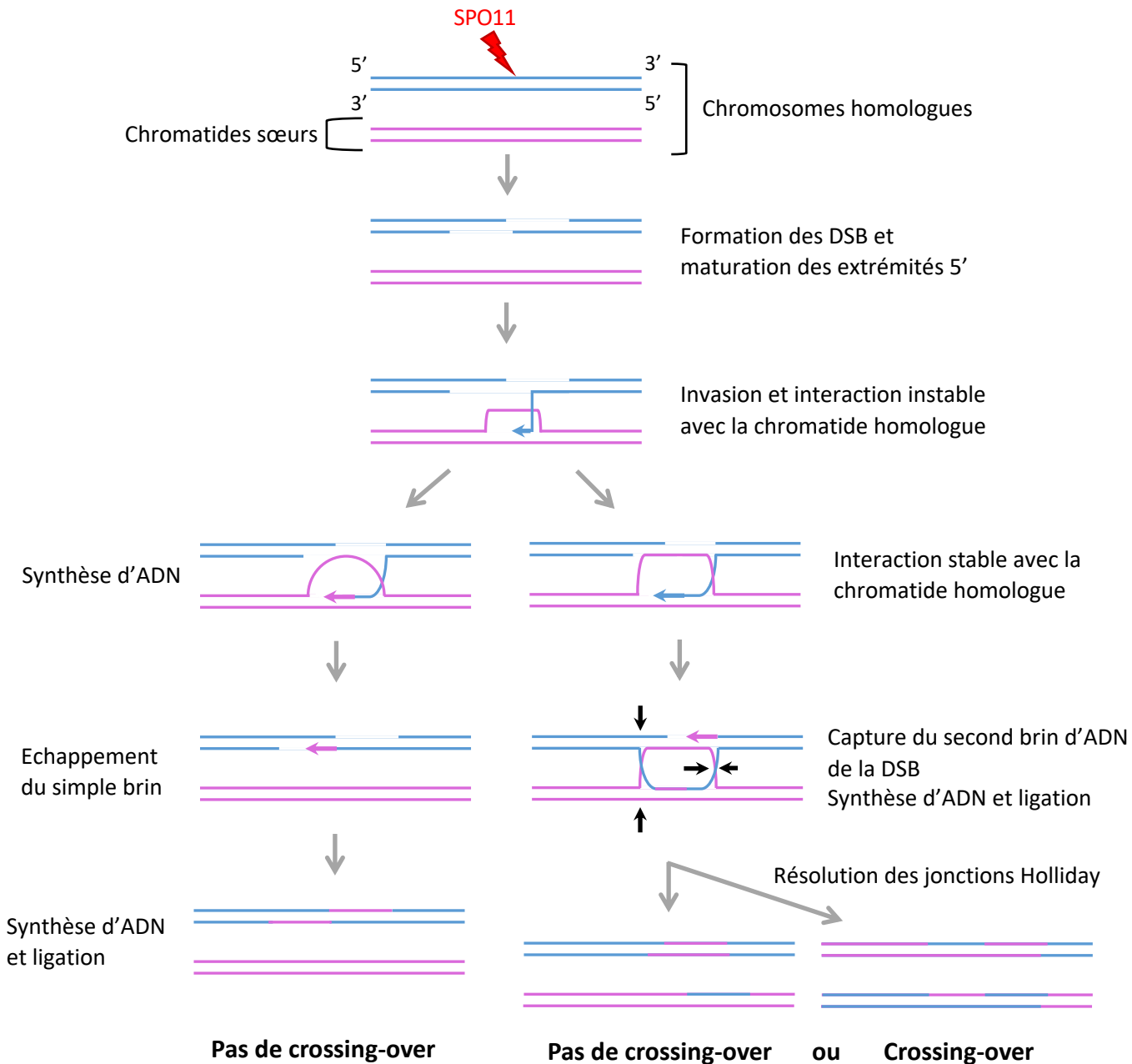


Figure 19 : Réparation des cassures doubles brins.

Les cassures doubles-brins générées par Spo11 sont réparées par des mécanismes générant des crossing-overs ou non crossing-over.

Les flèches noires mettent en évidence les croisements appelés les jonctions Holliday ou chiasmata. Ces jonctions sont clivées et réparées. Ces réparations peuvent entraîner des échanges de bras de chromosomes entre les paires homologues appelés les crossing-over.

création des chiasmas. Ces chiasmas sont la persistance d'un lien physique entre les chromatides des chromosomes homologues après le crossing-over. Ils sont indispensables pour l'alignement correct des chromosomes homologues le long de la plaque métaphasique et indispensable pour la diversité génétique. Les crossing-overs se forment au niveau des nodules alors appelés nodules tardifs ou nodules de recombinaisons et font alors intervenir d'autres systèmes protéiques. Chez l'homme et la souris, la protéine MLH3 se colocalise au niveau de ces nodules intermédiaires en début de pachytène (Lipkin *et al.*, 2002; Oliver-Bonet *et al.*, 2005). Au stade pachytène intermédiaire, MLH1 colocalise avec MLH3 et il se forme alors des hétérodimères MLH1-MLH3 (Kolas *et al.*, 2005). MLH1 et MLH3 ne se lient pas sur tous les foyers précédemment constitués de MSH4-MSH5 : ils sélectionnent certains foyers qui deviendront les crossing-overs. Les foyers MSH4-MSH5 qui ne lient pas MLH1-MLH3 sont réparés "classiquement" sans générer de chiasmas. Le nombre de nodules tardifs est largement inférieur au nombre de nodules précoces (Morelli and Cohen, 2005). Les souris invalidées pour *Mlh3* sont stériles. Chez ces mutants mâles, on retrouve bien des spermatocytes *Mlh3*^{-/-} en métaphase I de méiose mais ils présentent des défauts de ségrégation des paires de chromosomes aboutissant à l'apoptose des cellules germinales (Lipkin *et al.*, 2002). Aucun foyer MLH1 n'est observé chez ces mutants et les nodules de recombinaison ne se forment pas. MLH3 serait nécessaire pour le recrutement de MLH1 au niveau des crossing-overs. Les souris *Mlh1*^{-/-} mâles et femelles sont également infertiles. Chez les mâles, les paires de chromosomes se séparent prématurément et entraînent un arrêt de la méiose. L'absence de *Mlh1* altère la formation des chiasmas avec un nombre de foyers réduit par 10. MLH1, recruté par MLH3 au niveau des crossing-overs, intervient donc dans la formation des chiasmas (Baker *et al.*, 1996).

Chez la souris, la protéine PMS2 (pour *PMS1 homolog2, mismatch repair system component*) intervient dans la réparation des mésappariements de l'ADN. Seul les mâles mutés pour *Pms2* sont infertiles. Ces souris produisent des spermatozoïdes morphologiquement anormaux, conséquence du mauvais appariement des paires de chromosomes homologues (Baker *et al.*, 1995). Une étude plus récente à partir de la même mutation de *Pms2* a mis en évidence par Western blot que le niveau de protéine MLH1 diminue de 70% dans les testicules mutés par rapport aux testicules WT (Fischer *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que PMS2 aurait un rôle stabilisateur de MLH1 en amont de la formation des crossing-overs.

Au stade pachytène, seuls les autosomes sont appariés dans les spermatocytes. Les gonosomes X et Y n'étant pas totalement homologues, ils ne peuvent pas s'apparier sur toute leur longueur. La seule partie homologue de ces chromosomes est un segment distal appelé la PAR (pour *pseudoautosomal region*) qui est le lieu d'appariement des chromosomes X et Y. L'absence de synaspe complète des gonosomes entraîne, au début du stade pachytène, un remodelage de la chromatine

permettant leurs inactivations transcriptionnelles. Ils sont alors localisés à la périphérie nucléaire et forment un domaine de coloration dense appelé vésicule sexuelle (ou XY-body ou sex-body). L'inactivation transcriptionnelle des chromosomes X et Y est appelée le MSCI (pour *Meiotic sex chromosomes silencing*). Dans cette région des chromosomes XY non appariés se localise plusieurs protéines comme BRCA1 (pour *breast tumor suppressor gene 1*) et la protéine de réparation de l'ADN ATR (pour Ataxia telangiectasia and Rad3 related). La protéine ATR phosphoryle l'histone H2AX (variant de l'histone H2A) en γ H2AX, indispensable pour la mise en place du MSCI (Bellani, 2005; Turner *et al.*, 2004). Chez l'homme, BRCA1 est détecté par immunofluorescence sur étalement chromosomique dès le stade zygotène au niveau des axes non appariés des chromosomes puis au niveau de la PAR du stade pachytène (Scully *et al.*, 1997). Des études d'immunoprécipitation chez la souris montrent une interaction entre les protéines BRCA1 et ATR (Turner *et al.*, 2004). Les spermatocytes *Brca1*^{-/-} présentent un défaut de localisation de γ H2AX, un défaut de mise en place du MSCI, un mauvais recrutement de la protéine ATR (Broering *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2003) et les souris sont stériles du au blocage méiotique. Ces résultats montrent que BRCA1 est essentiel pour la localisation de ATR et γ H2AX.

La phosphorylation de H2AX au niveau de la sérine 139 (nommé alors γ H2AX) est observable par immunohistochimie sur tous les chromosomes à partir du stade leptotène, suite aux DSB créés par Spo11 (Mahadevaiah *et al.*, 2001; Rogakou *et al.*, 1999). γ H2AX disparaît progressivement lors de l'appariement des chromosomes homologues. Puis une seconde vague de phosphorylation de H2AX est observée sur toute la chromatine des gonosomes. Cette phosphorylation est nécessaire pour la condensation de la chromatine des chromosomes X et Y et l'initiation du MSCI (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003; Mahadevaiah *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2005). Les souris mâles déficiente en H2AX sont infertiles alors que les femelles sont fertiles (Celeste *et al.*, 2002). Les spermatocytes *H2AX*^{-/-} présentent un défaut d'appariement des chromosomes, ne réalisent pas le MSCI et ne forment pas le « XY body » (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003). La phosphorylation de l'histone H2AX est donc indispensable pour l'appariement des chromosomes homologues et pour la mise en place du MSCI.

La deuxième vague de phosphorylation de H2AX est dirigée par la protéine MDC1 (pour *mediator of DNA damage checkpoint 1*) qui est un partenaire de liaison γ H2AX (Ichijima *et al.*, 2011). Les souris invalidées pour le gène *Mdc1* présentent un phénotype proche des souris invalidés pour H2AX puisque les mâles sont infertiles et les femelles ont une fertilité réduite (Lou *et al.*, 2006). Les spermatocytes *Mdc1*^{-/-} présentent un arrêt de méiose au stade pachytène (Ahmed *et al.*, 2007). La première vague de phosphorylation de H2AX se déroule normalement à la suite des DSB. Par contre, la deuxième vague de phosphorylation de H2AX sur les gonosomes ne se fait pas empêchant l'initiation du MSCI et la

formation du « XY body » (Ichijima *et al.*, 2011). MDC1 est donc indispensable pour la deuxième vague de phosphorylation de H2AX.

L'inactivation transcriptionnelle des gonosomes par la mise en place du MSCI est également un processus indispensable pour le déroulement correct de la méiose. L'étude de souris XYY montre que les 2 chromosomes YY s'apparient et échappent ainsi au MSCI. Cela entraîne un arrêt de méiose au stade pachytène et l'apoptose de ces spermatocytes (Royo *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2006). L'absence du MSCI va entraîner l'expression des gènes du chromosome Y où certains d'entre eux sont responsables de l'arrêt de la méiose (Royo *et al.*, 2010). Il s'agit notamment des facteurs de transcription ZFY (pour *zinc finger protein Y-linked*), très conservés chez les mammifères malgré des différences entre l'homme et la souris (Koopman *et al.*, 1991). Chez l'homme, ZFY est un gène qui code pour 2 transcrits, alors que la souris possède 2 gènes paralogues *Zfy1* et *Zfy2* (Koopman *et al.*, 1991). Chez la souris, *Zfy1* et *Zfy2* sont localisés sur la région normalement non appariée du chromosome Y. Dans les conditions normales, l'expression de ces gènes est réprimée par le MSCI lors de la mise en place de XY body. L'expression ectopique des gènes *Zfy* (*Zfy1* et *Zfy2*) dans les testicules de souris entraîne un blocage de la méiose au stade pachytène intermédiaire et l'apoptose des spermatocytes (Royo *et al.*, 2010). Ainsi, la mise en place du MSCI est primordiale pour empêcher l'expression des gènes *Zfy*. Néanmoins, il a été montré que l'expression des gènes *Zfy* est finement régulée puisque leurs expressions sont nécessaires pour la mise en place du MSCI (Vernet *et al.*, 2016).

Les événements de réparation des DSB, la présence des crossing-overs et la mise en place du MSCI sont les événements clés du stade pachytène : ils composent un premier point de contrôle de la méiose. Il existe différents points de contrôle qui permettent de stopper la maturation de la cellule germinale si la méiose ne se déroule pas correctement. Si les différents événements de ce point de contrôle méiotique sont réalisés dans les conditions optimales alors la méiose se poursuit, sinon les cellules germinales arrêtent leur maturation et entrent en apoptose. Ce mécanisme de point de contrôle semble plus permissif durant la méiose femelle par rapport à la méiose mâle (Hunt and Hassold, 2002). En effet, plusieurs modèles de lignées murines ont mis en évidence des dimorphismes sexuels où la méiose mâle s'arrête alors que la méiose femelle, pour un même gène muté, continue assurant la fertilité (ou une sub-fertilité) de ces femelles (voir précédemment les invalidations des gènes *Sycp3*, *Pms2*, *H2ax*, *Mdc1*), comme c'est le cas notamment pour *Spo11* (Baudat *et al.*, 2000) ou *Msh4* (Kneitz *et al.*, 2000). Cette différence de stringence entre mâle et femelle pourraient être expliquée de plusieurs façons :

- Chez la femelle, les deux divisions méiotiques conduisent à la formation d'une seule gamète (et élimination de deux globules polaires) qui n'est jamais vraiment haploïde puisqu'un

spermatozoïde doit avoir pénétré dans le cytoplasme de l'ovocyte pour que la méiose II s'achève. Chez le mâle, à partir d'un spermatocyte, 4 cellules haploïdes identiques sont générées.

- La cinétique de méiose est différente entre la femelle (la méiose débute au stade foetal) et le mâle (la méiose débute après la naissance). La méiose femelle voit sa méiose stoppée deux fois : en fin prophase de méiose I (stade foetal) et en métaphase II. La méiose I s'achève lorsque l'ovocyte est ovulé. La méiose II s'achève seulement si l'ovocyte est fécondé. A l'inverse, la méiose mâle est un processus continu depuis la puberté.
- Les femelles possèdent un nombre limité de gamètes. Le nombre d'ovocytes est fixé à la naissance et la femelle perd, tout au long de sa vie, des cellules germinales. Ce nombre plus limité de gamètes chez la femelle pourrait engendrer un traitement plus permissif des anomalies de méiose femelle par rapport à celles des mâles.

A l'issue de ces observations, on peut donc imaginer facilement que les points de contrôle méiotiques ne sont pas les mêmes dans les deux sexes.

Au stade pachytène tardif, les chromosomes homologues sont appariés par le complexe synaptonémal à l'exception des chromosomes X-Y qui sont localisés dans une structure appelée « XY-body ». Des cassures d'ADN, localisant les crossing-overs, sont réparties le long des chromosomes appariés. La chromatine est extrêmement compactée avec des centrosomes étroitement liés grâce au complexe de cohésines.

iv. Diplotène :

La dissociation du complexe synaptonémal caractérise l'entrée au stade diplotène. Ce processus est contrôlé par la protéine HSPA2 (pour Heat shock-related protein 2) chez l'homme ou son homologue HSP70-2 chez la souris (Bonnycastle *et al.*, 1994). Seules les souris *Hsp70-2^{-/-}* de sexe mâle sont stériles. Aucun spermatocyte au stade diplotène n'est observé. Il n'y a pas de dissociation du complexe synaptonémal ce qui entraîne l'apoptose à la fin du stade pachytène (Dix *et al.*, 1997). HSP70-2 est localisé le long du complexe synaptonémal des spermatocytes en pachytène (Allen *et al.*, 1996).

En diplotène, lors du désassemblage du complexe synaptonémal, la localisation des protéines SYCP1 et SYCP3 est différente des stades précédents puisque retrouvée uniquement au niveau des centromères. A la fin du diplotène, SYCP1 n'est même plus détectable (Bisig *et al.*, 2012). Ceci émet l'hypothèse d'un rôle de SYCP3 lors de l'assemblage des kinétochores méiotiques.

Au cours de la dissociation du complexe synaptonémal, les chromosomes homologues restent cependant liés entre eux au niveau des chiasmata (résultant de crossing-over). Des nodules de

recombinaison sont remplacés progressivement par des chiasmas destinés aux crossing-overs. Au niveau des autres nodules, une réparation "classique" de l'ADN a lieu et les chromosomes se dissocient (**Figure 19**). La cohésine REC8, décrite précédemment, jouerait aussi un rôle important dans le maintien des chiasmas. Chez la levure, la mutation de *Rec8* entraîne une séparation prématurée des chromatides sœurs au cours de la prophase I de méiose (Klein *et al.*, 1999). Chez la souris, les spermatocytes *Rec8*^{-/-} ne présentent pas de foyer de recombinaison tardif MLH3-MLH1, ce qui empêche la formation de crossing-over et de chiasma (Bannister *et al.*, 2004). REC8 est donc essentielle pour la formation et le maintien des chiasmas jusqu'à la fin de la prophase I. D'autres cohésines impliqués dans l'appariement des chromosomes, tel que *Smc1β*, présente également un rôle dans le maintien des chiasma (Hodges *et al.*, 2005).

En même temps que le complexe synaptonémal se dissocie, les chromosomes se condensent au maximum et forment des bivalents morphologiquement distincts. Les nodules de recombinaison ne sont plus observables et ont laissé place aux chiasmas.

Comme évoqué précédemment, chez les mammifères femelles, ce stade diplotène de prophase I méiotique est le stade du premier blocage des cellules germinales de l'ovaire. Ce blocage a lieu durant la vie fœtale. Suivant les espèces, la puberté et la première ovulation ont lieu à des âges différents : le blocage méiotique peut ainsi durer de quelques jours (comme chez la souris) à plusieurs années (comme chez la femme).

v. *Diacinèse* :

La fragmentation de l'enveloppe nucléaire marque l'entrée des cellules en diacinèse. Cette fragmentation va entraîner une organisation des fuseaux méiotiques à partir du centre organisateur des microtubules (MTOC) pour accrocher les paires de chromosomes. Le MTOC est composé d'un centrosome (constitué de deux centrioles) entouré de protéines péricentriolaires (voir la partie **Introduction.II.C.1**). Chaque MTOC (2 par cellules au stade diacinèse) sont situés aux pôles de la cellule. Les fuseaux méiotiques organisés à partir des MTOC relient les paires des chromosomes aux pôles de la cellule. A ce stade, les chiasmas sont indispensables pour maintenir une liaison physique entre les chromatides sœurs des chromosomes homologues : chaque paire de chromosomes homologues doit avoir au moins un chiasma. Cette liaison physique permettra la création des jeux de tension, au niveau du fuseau méiotique, nécessaires pour l'organisation du fuseau bipolaire.

Le facteur MPF (pour *Maturation/Mitosis promoting factor*) régule l'entrée des cellules en métaphase durant la transition G2/M de la mitose et de la méiose. C'est un hétérodimère composé de l'enzyme catalytique CDK1 (pour *cycline dependant kinase 1* aussi appelé Cdc2) et de la cycline B1 (CCNB1). Le MPF est activé par CDC25 ou inactivé par Myt1/Wee1 (Kishimoto, 2015). La transition de

prophase I à métaphase I est seulement possible si le MPF est activé (**Figure 20**). La moindre anomalie empêchant l'activation du MPF entraîne un blocage de la méiose en fin de prophase – début de métaphase. C'est le second point de contrôle lors de la prophase I de méiose.

La cycline A1 (codé par le gène *Ccna1*) est exprimée spécifiquement dans les cellules germinales mâles à partir de la fin du stade pachytène jusqu'en métaphase de première division de méiose (Sweeney *et al.*, 1996). Les souris mâles *Ccna1*^{-/-} sont stériles et présentent des spermatocytes bloqués au stade diplotène tardif qui dégèrent par apoptose (Liu *et al.*, 1998). Les spermatocytes *Ccna1*^{-/-} sont bloqués à ce second point de contrôle de prophase I. Des expériences de Northern blot ont mis en évidence une diminution des ARN *Cdc25* dans les testicules adultes *Ccna1*^{-/-} et une réduction de l'activité des protéines du MPF (réduction de 80% de l'activité de CDK1 par rapport au souris hétérozygotes) (Liu *et al.*, 1998). Ainsi ces résultats laissent penser que l'activité du MPF n'est pas suffisante dans les spermatocytes *Ccna1*^{-/-} pour permettre la transition de la phase diacinèse à la métaphase I de méiose. La cycline A1 est donc essentielle pour la transition des spermatocytes diplotène-métaphase I.

Emi2 (early meiotic inhibitor 2 ou Fbxo43) est un autre gène dont la suppression chez la souris conduit à un blocage méiotique au stade diplotène (Gopinathan *et al.*, 2017) sans transition vers la métaphase I. L'expression de *Cdk1/Cyclin B1*, facteurs du MPF, est régulée à la baisse en absence de *Emi2* pouvant suggérer une coopération entre CCNA1 et EMI2 dans la régulation de la transition prophase – métaphase I. Contrairement à *Ccna1*, les femelles knockout *Emi2* sont également stériles.

La phosphorylation de H2AX disparaît au moment de la dispersion du sex-body lors de la transition diplotène-métaphase I (Mahadevaiah *et al.*, 2001). La disparition de γ H2AX permet une diminution de la condensation de la chromatine sexuelle pour assurer une conformation chromosomique appropriée pour la métaphase I (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003).

vi. *Métaphase I :*

Au stade de métaphase, les jeux de tensions exercés par les microtubules sur les chromosomes permettent leurs alignements le long de la plaque métaphasique.

Les fuseaux de microtubules, organisés à partir du MTOC, accrochent les paires de chromosomes au niveau des kinétochores. Le kinétochore est une structure trilaminaire multiprotéique situé au niveau des centromères. Ils sont essentiels pour l'accrochage des microtubules et la ségrégation correcte des chromosomes. Lors de la première division de méiose, les kinétochores sont localisés côte à côte au niveau des chromatides sœurs : cette organisation permet aux microtubules émanant du même pôle de capturer les kinétochores sœurs (**Figure 21A**). Cet

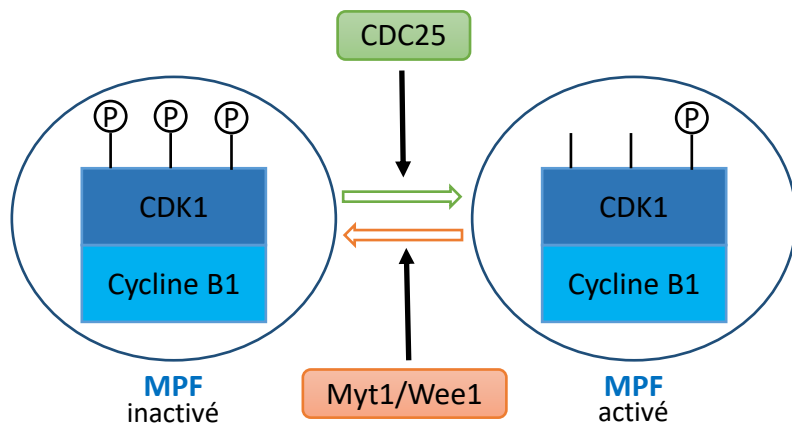


Figure 20 : Régulation de l'activation du MPF chez la souris (mitose et méiose).

Le MPF est composé des protéines CDK1 et Cycline B1. Le MPF est inactivé par la kinase Myt1/Wee1 qui phosphoryle CDK1. Lors de la transition G2/M, la phosphatase CDC25 dé-phosphoryle deux sites de CDK1 pour entraîner l'activation du MPF. L'activation du MPF dépend d'une balance entre l'activité de CDC25 et Myt1/Wee1.

Ⓟ : Site phosphorylé.

arrangement appelé attachement monopolaire relie chaque chromosome à un pôle de la cellule. Cet attachement est spécifique de la première division de méiose (Hauf and Watanabe, 2004).

La protéine MEIKIN (pour *Meiosis-specific kinetochore factor*) présente un rôle important pour l'attachement amphitélique des chromosomes en métaphase I. *Meikin* est conservé chez les vertébrés et présente une expression, chez la souris, uniquement dans les gonades (Kim *et al.*, 2015b). La protéine MEIKIN, observée par immunofluorescence, est retrouvée au niveau des centromères dans les spermatocytes I en phase pachytène de prophase I avant de disparaître en anaphase I. Chez la femelle, MEIKIN est observée aux mêmes stades. MEIKIN est donc spécifique de la première division de méiose. Les souris mâles et femelle invalidées pour *Meikin* sont infertiles. L'étude des ovocytes et des spermatocytes *Meikin*^{-/-} a mis en évidence une séparation anormale des chromatides sœurs en anaphase I (Kim *et al.*, 2015b). D'après ces observations, MEIKIN semble jouer un rôle dans l'association des kinétochores sœurs pour assurer la ségrégation correcte des chromosomes en partenariat avec PLK1 (Polo like Kinase 1) (Kim *et al.*, 2015b).

Pour éviter toute erreur de ségrégation des chromosomes, un troisième point de contrôle méiotique est mis en place lors de la métaphase I. Il s'agit du point de contrôle SAC (pour *spindle assembly checkpoint*). D'abord découvert chez la levure, le SAC est conservé chez les eucaryotes. Il surveille l'orientation correcte des paires de chromosomes, la répartition des microtubules et la tension exercée sur les kinétochores en méiose et en mitose. Ce complexe est composé des protéines MAD1 (pour *Mitotic arrest deficient 1*), MAD2, BUB1 (pour *Budding uninhibited by benomyl*), BUB3, BUBR1 (pour *Mad3/Bub1 related*), MPS1 (pour *Monopolar spindle 1* aussi appelé Ttk) ainsi que d'autres protéines dont l'expression et/ou la localisation est finement régulée. Les composants du SAC sont localisés aux niveau des kinétochores non appariés et empêchent l'entrée en anaphase I tant que les chromosomes ne sont pas correctement attachés aux microtubules. Les études du SAC durant les divisions de méiose ont essentiellement été réalisées dans les ovocytes. La protéine MPS1 est conservée de la levure à l'Homme (Hached *et al.*, 2011). L'absence de MPS1 dans les ovocytes de souris *in vitro* entraîne un passage plus rapide au stade d'anaphase I par rapport aux ovocytes contrôles. Il a été observé que 70% des ovocytes mutés contre 10% des ovocytes contrôles présentent des aneuploïdies en anaphase I (Hached *et al.*, 2011). L'absence de MPS1 entraîne des défauts de ségrégation des chromosomes dans les ovocytes. MPS1 semble donc nécessaire pour freiner un passage trop précoce en métaphase et une mauvaise ségrégation des chromosomes. Le rôle de MPS1 dans les spermatocytes reste à démontrer.

Lorsque les chromosomes homologues sont correctement alignés le long de la plaque métaphasique, l'inactivation du SAC permet la transition en anaphase I. Lorsque le SAC est inactivé,

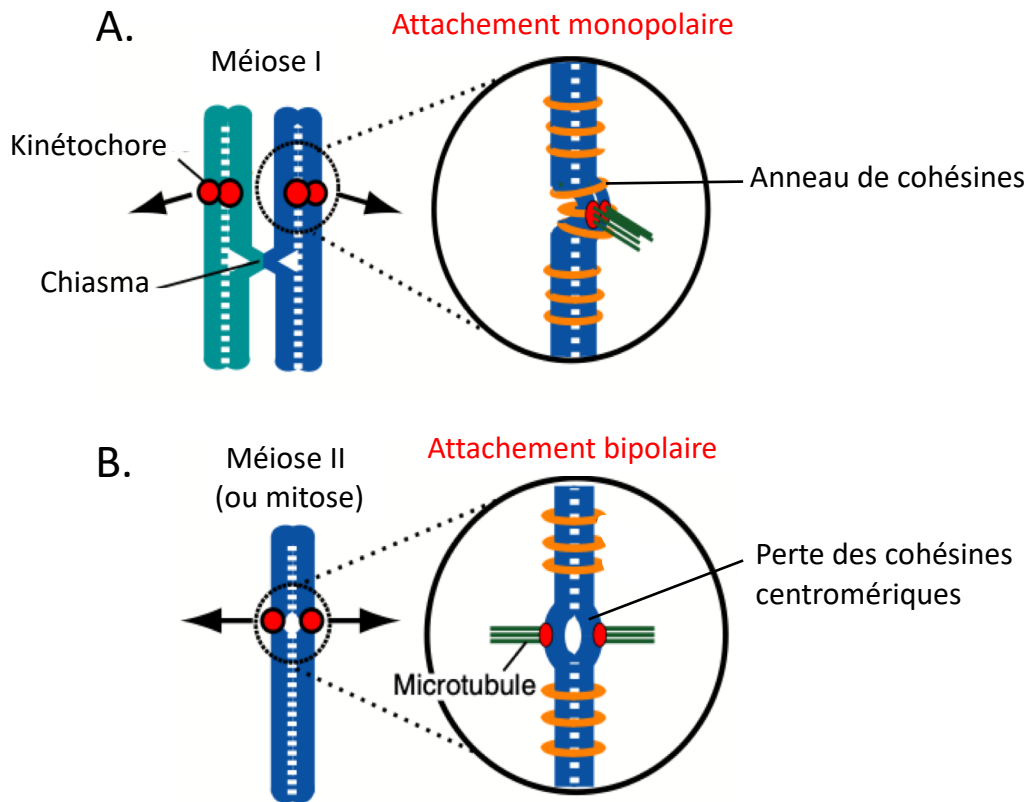


Figure 21 : Attachement monopolaire ou bipolaire des chromosomes aux microtubules.

(A) La cohésion des centromères des chromatides sœurs entraîne une orientation monopolaire des kinétochores sœurs lors de la première division de méiose. **(B)** La perte des cohésines centromériques en deuxième division de méiose (ou en mitose) entraîne une orientation et un attachement bipolaires des kinétochores.

Adapté de Ishiguro et al., 2019.

Cdc20 peut activer le complexe APC/C (pour anaphase-promoting complex/cyclosome ; **figure 22**). Ce complexe APC/C ubiquitinyne et inactive la cycline B et la sécurine. Cette dernière est une endopeptidase qui inhibe la séparase. Donc, lorsque la sécurine est dégradée, la séparase est alors activée. La séparase agit en clivant les cohésines qui attachent les paires de chromosomes entre-elles. Seuls les centromères restent protégés de la séparase par la protéine Shugoshin-2 (revue Sun and Kim, 2012).

En conclusion, lorsque tous les chromosomes sont attachés et alignés le long de la plaque métaphasique, la métaphase est amorcée par inactivation du SAC. Le spermatocyte s'engage vers les stades de l'anaphase puis de la télophase de première division de méiose.

vii. Anaphase I :

Lors de l'anaphase, les chromosomes sont tirés aux pôles opposés de la cellule germinale. Les paires de chromosomes sont donc séparés suite à la résolution des chiasmas entre les bras de chromosomes homologues.

A la fin de l'anaphase I, chaque paire de chromosomes se situe à un pôle opposé de la cellule germinale et les cellules ont une forme allongée qui annonce la division cellulaire.

viii. Télophase I :

Lors de la télophase, le fuseau méiotique disparaît. Une nouvelle membrane cellulaire se forme au centre de la cellule allongée permettant la formation de deux cellules filles. Chacune d'elle possède n chromosome à deux chromatides. Ces cellules germinales nouvellement formées sont appelées les spermatocytes secondaires (II). Le noyau des spermatocytes II est de taille réduite et la chromatine est légèrement granuleuse.

b. La deuxième division de méiose :

La deuxième division de méiose est fugace. Cette division de méiose est appelée division équationnelle. Elle est similaire à une mitose classique mais avec seulement 2n chromosomes. Les chromatides sœurs des chromosomes sont ségrégués dans une cellule fille différente. Pour cela, les kinétochores sont organisés dos à dos au niveau des chromatides sœurs. Cet arrangement permet l'accrochage de chaque chromatide sœur au fuseau méiotique : c'est l'accrochage bipolaire (**Figure 21B**). Les cellules filles obtenues suite à la deuxième division de méiose sont appelées les spermatides rondes.

Ainsi, à partir d'un spermatocyte primaire possédant 4n chromosomes, la méiose a permis d'obtenir 4 spermatides rondes haploïdes et génétiquement différentes.

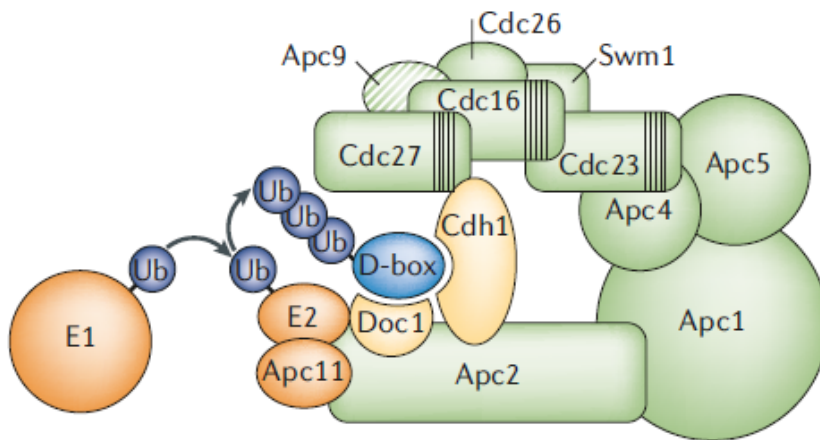


Figure 22 : Représentation schématique du complexe APC/C.

Le complexe APC/C est composé de 12 sous-unités différentes associées à des cofacteurs d'ubiquitinylation (composé d'une enzyme activatrice (E1), d'une enzyme conjuguante (E2) et de l'ubiquitine ligase (E3 ou Apc11) représentées en orange) et des co-activateurs (en vert).

Les substrats recrutés par APC/C possèdent une "D-box" ou une "KEN-box" reconnues par CDH1. Les protéines DOC1 et CDH1 indiquées en jaune sont impliquées dans la reconnaissance des substrats.

Issue de Peters, 2006.

C. Mise en place du fuseau mitotique et méiotique : le centrosome et les microtubules

La mise en place du fuseau de microtubules et des éléments du cytosquelette associés à la division cellulaire ont été étudiés principalement au cours de la mitose. Concernant la division méiotique, la bibliographie disponible se réfère à la division des cellules germinales femelles, donc dans l'ovocyte. La bibliographie est quasiment inexistante pour la méiose mâle. Les paragraphes suivants illustrent donc la mise en place et la régulation des fuseaux mitotiques.

1. Le centrosome ou MTOC en mitose

Le centrosome également appelé MTOC comprend une paire de centrioles entourée de matériel péricentriolaire (PCM pour *pericentriolar material*). Le PCM est composé d'une centaine de protéines essentielles pour les fonctions des centrosomes durant les divisions de méiose et de mitose, pour l'architecture cellulaire et la signalisation (Gomes *et al.*, 2005; Thery *et al.*, 2006). Durant le cycle cellulaire, les centrosomes subissent plusieurs modifications (décrites dans la **figure 23**). Le centrosome est très conservé au cours de l'évolution pour la structure du centriole et la composition protéique autour des centrioles (Carvalho-Santos *et al.*, 2010; Hodges *et al.*, 2010).

Durant la phase G1 de mitose, Asterless/Cep152 (Cep152 pour *centrosomal protein 152*, orthologue de la protéine Asterless de la drosophile) s'accumule au niveau de la partie proximale des centrioles et recrute PLK4 (pour *Polo like kinase 4*) nécessaire pour la duplication des centrioles mitotiques (Cizmecioglu *et al.*, 2010; Hatch *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013b; Varmark *et al.*, 2007). Des expériences en cellules humaines ont mis en évidence que les protéines CEP152 et PLK4 interagissent directement entre elles (Cizmecioglu *et al.*, 2010). L'ajout de siARNs dirigés contre *Cep152* a mis en évidence que la sous-expression de *Cep152* empêche la duplication des centrioles. 25% des cellules déplétées pour *Cep152* présentent un fuseau mitotique monopolaire contre 5% pour les cellules contrôles (Cizmecioglu *et al.*, 2010; Hatch *et al.*, 2010). Le même phénotype est observé dans des cellules où Plk4 est inactivé (Habedanck *et al.*, 2005). Enfin la surexpression de Plk4 dans des cellules appauvries en Cep152 a mis en évidence un défaut d'amplification et de duplication des centrioles (Cizmecioglu *et al.*, 2010; Habedanck *et al.*, 2005). Ces résultats mettent en évidence que la protéine CEP152 est nécessaire pour l'activité de PLK4, l'ensemble permettant la duplication des centrioles au cours de la mitose des cellules en culture.

La duplication des centrioles mitotiques nécessite également une coopération entre les protéines PLK4, CDK2, CP110/CCP110 (pour *Centriolar coiled coil protein 110 kDa*) et SAS-6 (pour *Spindle assembly abnormal protein 6*) (Habedanck *et al.*, 2005). La protéine SAS-6 est nécessaire lors de la

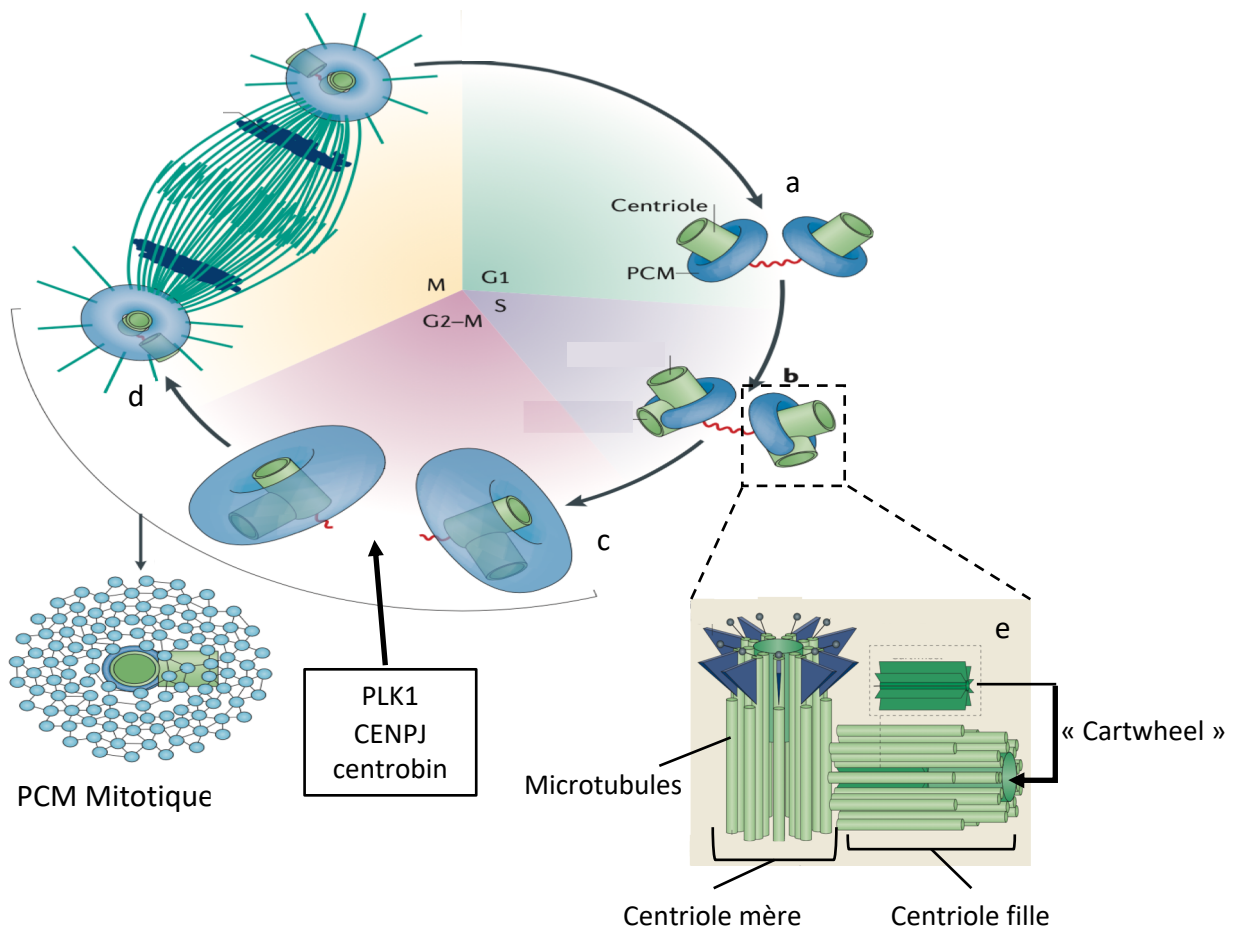


Figure 23 : Evolution du MTOC pendant le cycle cellulaire mitotique.

a - Les cellules nouvellement formées après la mitose comportent deux centrioles (appelés centrioles mères) reliés entre eux en phase G1. **b** - Durant la phase S, les centrioles se dupliquent et forment un centriole fille immature à partir de chaque centriole mère. Le centriole fille se positionne en angle droit par rapport au centriole mère. **c** - Pendant la phase G2/M, les centrioles recrutent davantage de matériel péricentriolaire (PCM), ce qui entraîne la séparation des paires de centrioles positionnés alors aux pôles opposés de la cellule. **d** - La maturation du PCM et des centrioles permet la nucléation des microtubules à partir des centrosomes, l'organisation des microtubules et la formation du fuseau mitotique. Chaque paire de centriole est destinée à une cellule fille. Dans la cellule fille, le centriole mère et fille se séparent mais restent associés par un lien flexible. **e** - Les centrioles nouvellement formés (centriole fille) s'organisent autour de la structure appelée le « cartwheel ». Chez les vertébrés, les microtubules sont généralement organisés en triplet de microtubules autour du « cartwheel ».

Adaptée de Conduit *et al.*, 2015.

duplication des centrioles pour assurer la formation de la structure « Cartwheel-like » des centrioles (**Figure 23e**) (Kitagawa *et al.*, 2011; Strnad *et al.*, 2007).

Lors de la phase G2/M, les centrosomes deviennent matures et les centrioles mère et fille se désengagent (**Figure 23c**). Le désengagement des centrioles (perte de l'orientation orthogonale de la paire des centrioles) est régulé par l'activité de la kinase PLK1 qui favorise la maturation du centriole fille et par conséquent l'éloignement des centrioles fille-mère (Shukla *et al.*, 2015). PLK1 agit avec les protéines CENPJ (pour centromere protein J, aussi appelé SAS-4 pour Spindle assembly abnormal protein 4 ou CPAP) et la centrobine qui sont nécessaires pour la stabilisation des centrioles filles. La déplétion de CENPJ et de la centrobine dans des cellules HeLa inhibe l'éloignement du centriole fille et le désengagement des centrioles (Shukla *et al.*, 2015). CENPJ, centrobine et PLK1 sont donc nécessaires pour assurer les désengagements des centrosomes durant la phase G2/M de mitose des cellules HeLa.

Chez plusieurs eucaryotes dont les plantes et les champignons, le fuseau mitotique se forme en absence de centrioles indiquant qu'ils ne sont pas indispensables pour la formation d'un fuseau bipolaire de mitose chez ces espèces (Lüders and Stearns, 2007).

Enfin, la maturation des centrioles filles se traduit par une accumulation des protéines du centrosome tels que CEP135, CEP120 ainsi que la POC5 (pour *POC5 centriolar protein*) au niveau des centrioles (Azimzadeh *et al.*, 2009; Mahjoub *et al.*, 2010). La maturation des centrosomes permet également de recruter les protéines nécessaires au niveau du PCM pour la métaphase de mitose.

2. Le fuseau bipolaire mitotique : la nucléation des microtubules

Les microtubules sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme le transport de protéines et d'organelles, la polarité cellulaire, la formation des fuseaux de méiose et de mitose. Les microtubules sont des polymères composés de tubuline α et β qui polymérisent entre eux. L'orientation des protéines dans le polymère donne aux microtubules une polarité intrinsèque : les microtubules sont orientés avec une extrémité positive (« plus end »), plus dynamique, qui s'éloigne du centrosome et une extrémité négative (« minus end »), proche du centrosome (Lüders and Stearns, 2007). Les filaments de microtubules s'allongent en polymérisant du côté de l'extrémité positive et diminuent en taille en dépolymérisant au niveau de l'extrémité négative (**Figure 24**). L'étude des fuseaux mitotiques a mis en évidence la présence de plusieurs sous-classes de microtubules nommées les microtubules inter-polaires, les microtubules astraux et les fibres-K (fibres de kinétochore). Ils sont décrits dans la **figure 25**.

Pendant la division de mitose, deux voies de nucléation indépendantes l'une de l'autre permettent la mise en place du fuseau bipolaire : l'assemblage des microtubules issus des centrosomes et l'assemblage des microtubules en absence de centrosomes.

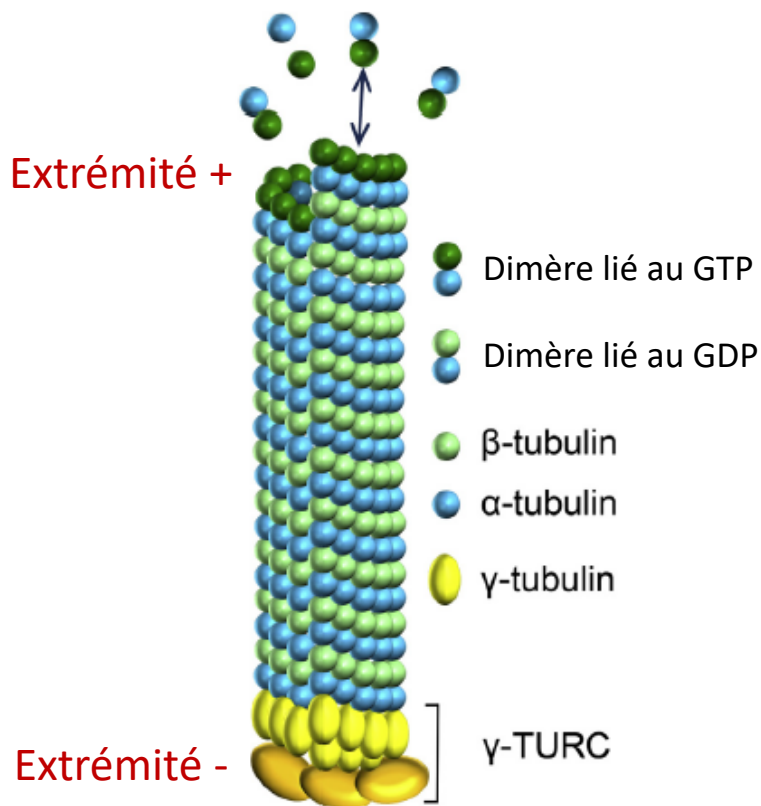


Figure 24 : Organisation des microtubules.

La nucléation des microtubules est initiée à partir des anneaux de γ -TURC composés γ -tubuline . Les microtubules sont composés de dimères α et β -tubuline qui polymérisent à partir de l'extrémité + du microtubules. Les dimères de tubuline liés au GTP polymérisent et hydrolysent le GTP en GDP. Les dimères de tubuline liés au GDP sont moins stables et enclin à la dépolymérisation. Ainsi, les microtubules peuvent plus ou moins s'allonger : c'est la dynamique des microtubules.

Issue de O'Donnell et O'Bryan, 2014.

Durant la phase G2-M, l'activité de nucléation augmente au niveau des centrosomes où la γ -tubuline est recrutée pour former des complexes de protéines en forme d'anneaux appelés γ -TuRCs (pour *gamma-tubuline ring complexes*). Ces complexes γ -TuRCs entraînent la nucléation des microtubules (**Figure 24**). Ces γ -TuRCs sont encrés au niveau du centrosome grâce à l'action de la protéine NEDD1 (pour *Neural precuresor cell expressed, developmentally downregulated gene 1*) (Haren *et al.*, 2006). C'est la phosphorylation de NEDD1 par CDK1 et PLK1 qui favorise l'interaction de NEDD1 avec la γ -tubuline du complexe γ -TuRC (Zhang *et al.*, 2009). Le ciblage *in vitro* de *Plk1* par des siARNs entraîne une diminution de la phosphorylation de NEDD1 aboutissant à une diminution du recrutement de γ -TuRC aux centrosomes et des défauts du fuseau mitotique (Zhang *et al.*, 2009). Un phénotype similaire est observé lorsque la protéine NEDD1 est sous-exprimée (Haren *et al.*, 2006). Ainsi, la localisation des complexes de γ -TuRC en quantité suffisante au niveau des centrosomes est essentielle pour assurer la formation d'un fuseau mitotique à partir des centrosomes. Ces microtubules issus des centrosomes sont appelés les **microtubules astraux et interpolaire**s (**Figure 25**). La nucléation des microtubules aux centrosomes favorise la séparation et la migration des deux centrosomes dupliqués aux pôles opposés de la cellule en début de mitose

La deuxième voie de nucléation des microtubules intervient également lors de la mitose et se déroule indépendamment des centrosomes. Elle intervient au niveau des chromosomes lors de la dissolution de l'enveloppe nucléaire. Cette dissolution active la voie RanGTP (décrite dans la **figure 26A**) et entraîne la nucléation des microtubules à partir des sites γ -TuRCs présents à proximité de la chromatine (Carazo-Salas *et al.*, 2001; Wilde *et al.*, 2001). En parallèle, le complexe CPC (pour *chromosomal passenger complex*) situé à proximité des kinétochores stabilise les microtubules nouvellement formés. Le complexe CPC est composé des protéines Aurora B, INCENP (pour *inner centromere protein*), Dasra A/B (également nommés Cdc8 et Borealine respectivement) et Survivin (Kelly *et al.*, 2007; Tulu *et al.*, 2006). La kinase Aurora B, localisée au niveau des centromères, phosphoryle des facteurs de déstabilisation des microtubules comme KIF2C (pour *kinesin family member 2C* aussi appelé MCAK) et STMN1 (pour *Stathmin 1* aussi appelé OP18) présents à proximité des kinétochores pour les rendre inactifs (Kelly *et al.*, 2007; Tulu *et al.*, 2006). Le CPC agit donc à proximité des centrosomes et des kinétochores pour créer une zone favorable à l'assemblage des microtubules en inhibant la déstabilisation des microtubules nouvellement formés (**Figure 26B**).

La polymérisation des microtubules est amplifiée par la voie de signalisation dépendante de l'augmin (Meunier and Vernos, 2016). L'augmin est un complexe constitué de 8 sous-unités protéiques HAUS 1 à 8 (pour *homologue to augmin subunits 1 to 8* ou Dgt1 à 8 chez la drosophile). L'augmin est essentielle pour la métaphase de mitose dans des cellules humaines. Des expérimentations, sur des cultures cellulaires déplétées pour chaque sous-unités de l'Augmin, ont mis en évidence une

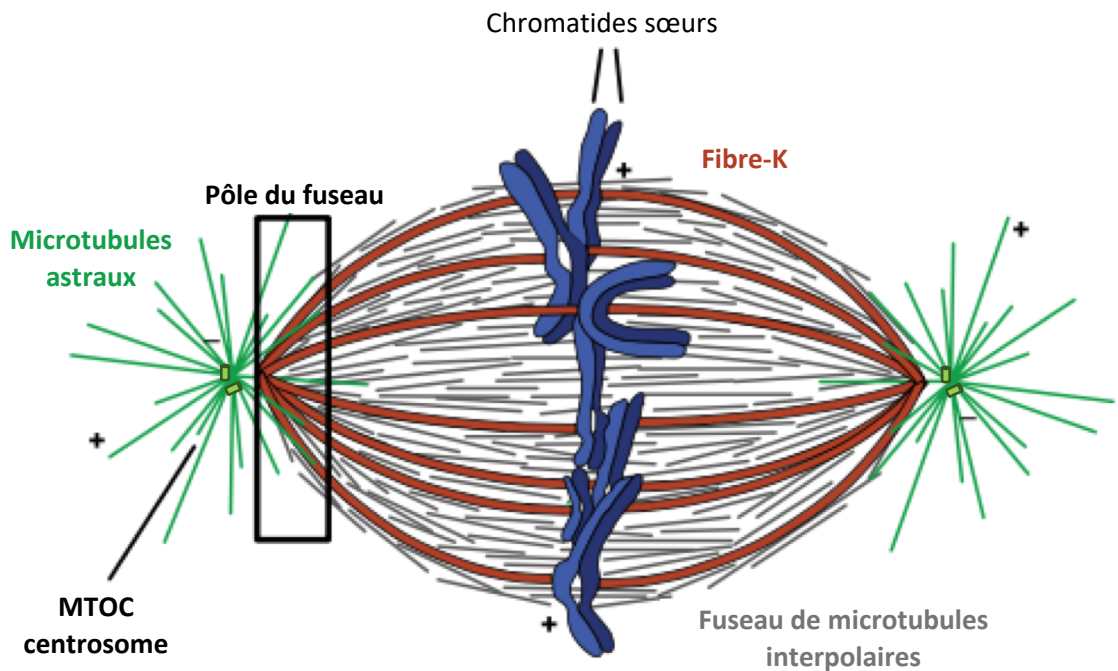


Figure 25 : Les populations de microtubules du fuseau méiotique.

Le fuseau méiotique est formé de 3 populations de microtubules : les microtubules astraux (vert); les microtubules interpolaire (gris) et les fibres K (rouge). Les microtubules orientent leurs extrémités positives (« plus end » ou « + ») vers le centre du fuseaux alors que les extrémités négatives (« minus end » ou « - ») sont orientées vers les MTOC localisés aux pôles de la cellule. Les fibres K sont moins dynamiques que les microtubules astraux et accrochent les chromosomes au niveau de leurs kinétochores.

Issue de Helmke *et al.*, 2013.

diminution du nombre de microtubules, un défaut de localisation de γ -TuRCs à proximité des centrosomes ainsi qu'une diminution du nombre de cellules réalisant la métaphase de mitose (Uehara *et al.*, 2009). Ainsi l'augmin joue un rôle important dans l'établissement du fuseau mitotique. L'augmin amplifie la formation des microtubules autour des centromères en créant des ramifications de microtubules à partir de ceux précédemment formés par la voie RanGTP (**Figure 26C**) (Meunier and Vernos, 2016; Uehara *et al.*, 2009). L'extrémité positive des microtubules nouvellement formés est ensuite capturée et attachée aux kinétochores grâce au complexe KMN (pour *KNL1*, *Mis12*, and *Ndc80 complex*) (Cheeseman *et al.*, 2006; Khodjakov *et al.*, 2003) (**Figure 26D**). Ces microtubules alors appelés les **fibres K** sont des microtubules moins dynamiques que les microtubules astraux et interpolaires avec une extrémité négative plus stable. Il a été mis en évidence que la protéine MCRS1 (pour *Microspherule protein 1*) se localise spécifiquement à l'extrémité négative des fibre K. En culture cellulaire, l'ajout de siARN dirigés contre le transcrite *Mcrs1* entraîne un défaut de l'assemblage des microtubules à proximité des chromosomes. Les cellules présentent un blocage en métaphase de mitose (Meunier and Vernos, 2011). La stabilisation des fibre K est donc essentielle pour la formation d'un fuseau mitotique correcte et l'achèvement de la métaphase.

Ainsi, la formation du fuseau de mitose se fait à partir des deux paires de centrioles aux pôles opposés de la cellule qui organisent les microtubules astraux et interpolaires et à partir des microtubules qui s'organisent autour des chromosomes comme les fibres K.

3. Qu'en est-il lors de la méiose ?

Les ovocytes constituent l'outil principal pour l'étude de la formation du fuseau méiotique. En effet, l'accès aux ovocytes et la quantité de matériel qui peut être utilisé constitue un avantage majeur pour l'étude du fuseau méiotique par rapport à des cellules germinales mâles. Les études dans les ovocytes de mammifère ont permis de mettre en évidence un nombre important de facteurs communs retrouvés en mitose et en méiose. Ces observations soulignent que les mécanismes de formation des fuseaux mitotiques et méiotiques utilisent des mécanismes similaires.

Chez plusieurs espèces de vertébrés (comprenant la drosophile, le xénope, le poulet, la souris et l'Homme), une différence majeure lors de la division de méiose entre une cellule germinale femelle et une cellule germinale mâle concerne la formation du fuseau méiotique. En effet, chez la femelle, cette formation du fuseau se met en place en absence de centrosome (Manandhar *et al.*, 2005). La division de méiose chez la femelle est dite acentrosomale. Dans ces ovocytes, il semble que les MTOC acentriolaires et la nucléation des microtubules à proximité de la chromatine sont suffisants pour l'assemblage du fuseau méiotique acentrosomal (Schuh and Ellenberg, 2007).

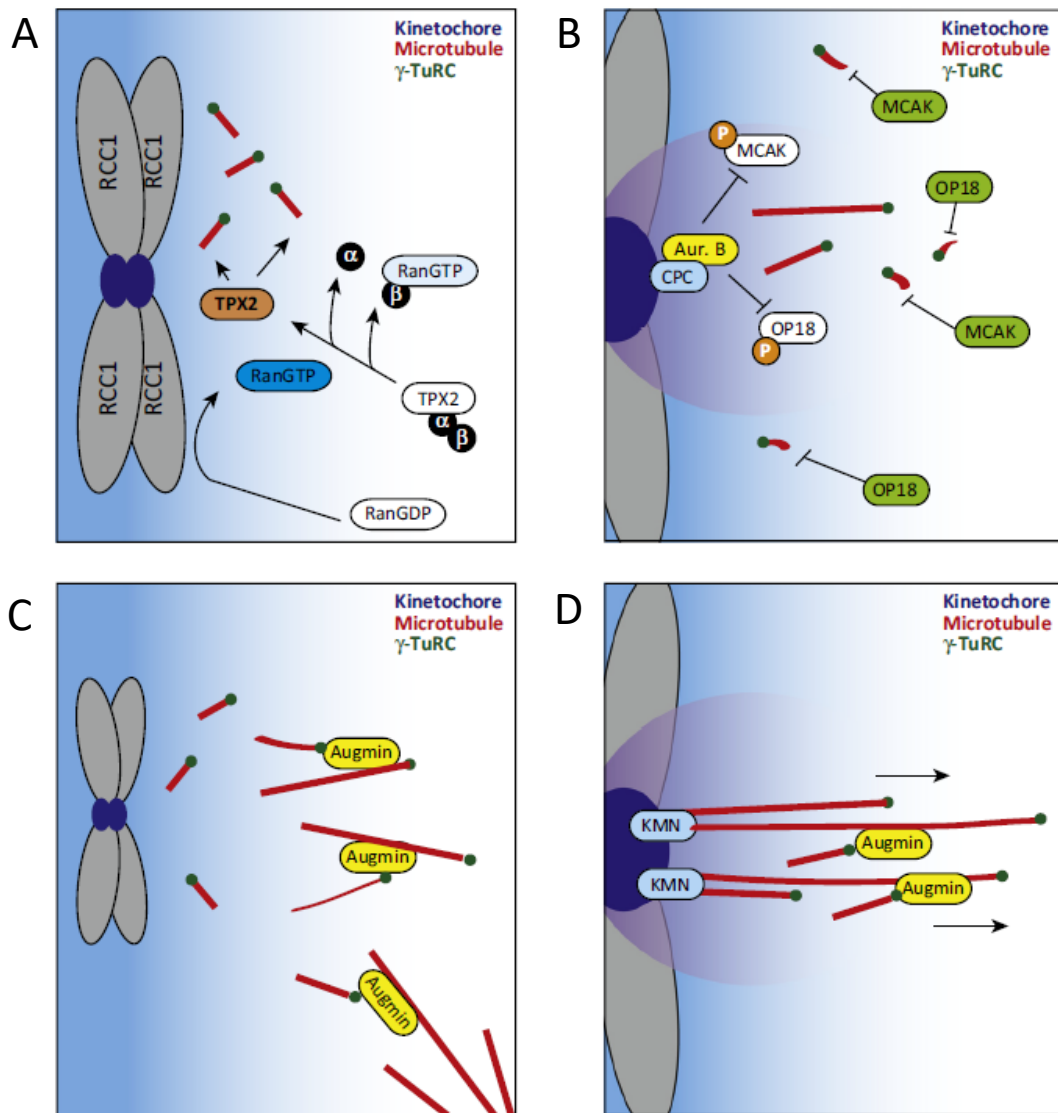


Figure 26 : Polymérisation des microtubules indépendamment du centrosome au cours de la mitose.

(A) La nucléation des microtubules a proximité des chromosomes dépend de la concentration en RanGTP (Kaláb et al., 2006). Le RanGDP à proximité de la chromatine est converti en RanGTP grâce au facteur d'échange nucléotidique RCC1 (pour *regulator of chromosome condensation 1*) localisé au niveau de la chromatine. Ce phénomène entraîne une augmentation de la concentration en Ran-GTP autour de la chromatine. Ran-GTP possède une forte affinité à l'importine β à laquelle il se lie. Cette liaison entraîne la dissociation du complexe protéique formé par l'importine α et β et la protéine TPX2 (pour *TPX2 microtubule nucleation factor*). Une fois libérée, TPX2 permet la formation d'un supra-complexe (comprenant la γ -TuRC) requis pour la nucléation des microtubules à proximité de la chromatine (Scrofani et al., 2015). **(B)** Les microtubules nouvellement formés sont stabilisés par le complexe CPC comprenant la protéine Aurora. Cette protéine est localisée au niveau du centromère où elle agit en inhibant les facteurs de déstabilisation des microtubules. **(C)** La protéine Augmin amplifie le phénomène de nucléation des microtubules à proximité des chromosomes. Augmin se fixe sur les microtubules déjà formés et favorise la nucléation de nouveau microtubules. **(D)** Le complexe KMN permet l'ancrage des microtubules (Fibre-K) au niveau des kinétochores (Cheesman et al., 2006).

Aur. B : aurora B ; MCAK : mitotic centromere-associated kinesin (KIF2C) ; OP18 : oncoprotein 18 (ou Sthathmin, STMN1).

Issue de Meunier et Vernos, 2016.

Des kinésines, tels KIF11 (pour *Kinesin family member 11* aussi appelée Eg5) très conservée chez les vertébrés, sont essentielles pour l'établissement du fuseau méiotique acentrosomal dans les ovocytes. L'inhibition de KIF11 avec du monastrol bloque l'assemblage des asters dans les ovocytes murins. Les ovocytes traités ne présentent pas de fuseau bipolaire (Schuh and Ellenberg, 2007). Ces observations mettent en évidence la fonction essentielle de KIF11 dans la bipolarisation et la mise en place du fuseau méiotique acentrosomale dans les ovocytes. Chez les souris mâles, des immunofluorescences ont mis en évidence que KIF11 est exprimée dans toutes les cellules germinales durant la spermatogenèse. La protéine est localisée au niveau des microtubules du fuseau méiotique des spermatogonies, des spermatocytes et au niveau de la manchette dans les spermatides allongées (She *et al.*, 2020). L'injection de substance inhibitrice de KIF11 dans le testicule entraîne différentes anomalies durant la spermatogenèse. Une partie des spermatocytes traités sont bloqués en métaphase et présentent un fuseau monopolaire avec des chromosomes éparpillés autour du fuseau. De plus, les cultures de cellules GC-2 spd (ts) présentent une augmentation du nombre des cellules comportant un fuseau monopolaire en absence de KIF11 (She *et al.*, 2020). La kinésine KIF11 aurait donc un rôle essentiel dans la formation du fuseau bipolaire de méiose chez les souris mâles. L'inactivation de KIF11 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce (Chauvière *et al.*, 2008), la kinésine KIF11 est aussi impliquée dans la mise en place et la dynamique du fuseau mitotique (Blangy *et al.*, 1995; Ferenz *et al.*, 2010).

Ces observations mettent en évidence que des protéines tels que KIF11 conservent des fonctions similaires pour la mise en place du fuseaux mitotique et méiotique chez le mâle et la femelle par des mécanismes similaires. Ainsi, l'étude des gènes régulant la formation du fuseau bipolaire en mitose peut aider à l'avancée des connaissances sur la formation du fuseau bipolaire en méiose.

Les centrosomes, non essentiels durant la méiose femelle dans certaines espèces, jouent un rôle fondamental lors de la spermatogenèse. Ils sont présents durant la mitose pour le renouvellement des spermatogonies, et pendant la méiose des spermatocytes ainsi que pour la formation du flagelle lors de la spermiogénèse (Avidor-Reiss and Fishman, 2019). Il semblerait que les centrioles retrouvés dans les spermatogonies et les spermatocytes ne soient pas différents de ceux retrouvés dans les cellules somatiques contrairement aux centrioles présents dans les spermatides (Avidor-Reiss and Fishman, 2019).

Chez la drosophile, il a été montré que, pendant la méiose, les centrosomes sont indispensables pour la formation du fuseau méiotique chez le mâle (Gatti *et al.*, 2012). La perturbation de la fonction des centrosomes dans les spermatocytes (par une mutation de protéine centriolaire telle que *Asterless* ou *Dspd-2* (pour *Drosophila spindle defective 2*)) empêche la formation correcte d'un fuseau méiotique

(Bucciarelli *et al.*, 2003). Des microtubules polymérisent autour de la chromatine mais ce n'est pas suffisant pour une bonne formation du fuseau bipolaire (Bonaccorsi *et al.*, 1998; Giansanti *et al.*, 2008). Ces résultats chez la *Drosophile* laissent penser que les centrosomes sont indispensables pour la mise en place fuseau méiotique dans les spermatocytes d'autres espèces.

D. La spermiogénèse :

La spermiogénèse est l'étape finale de la spermatogénèse. Elle permet aux spermatides rondes haploïdes issues de la méiose de se différencier en spermatozoïdes. Cette étape dure environ 23 jours chez l'homme et 14 jours chez la souris soit environ un tiers de la durée de la spermatogénèse. La spermiogénèse comprend plusieurs changements morphologiques tels que la condensation et l'allongement du noyau, la formation de l'acrosome et du flagelle ainsi que la réduction du cytoplasme. Ces changements morphologiques sont répertoriés en 16 étapes chez la souris (**Figure 14**) en fonction de la forme de l'acrosome et du noyau. Les spermatides rondes nouvellement formées après la deuxième division méiotique ont un taux de transcription élevé, présentent un noyau central et commencent à assembler l'axonème et l'acrosome (étapes 1 à 8). Puis les spermatides s'allongent et la machinerie de transcription commence à s'arrêter : ces cellules germinales sont alors des spermatides allongées (étapes 9 à 11). L'ADN ainsi que le noyau se condensent pour former les spermatides condensées (étapes 12 à 13) puis ils se différencient en spermatozoïdes avec un aspect typique de la tête, en forme crochet chez la souris (étapes 14 à 16) (**Figure 27**). Lorsque les spermatozoïdes sont complètement formés, on peut observer 3 fragments: la tête, la pièce intermédiaire et la queue (**Figure 28A**). Alors, les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière des tubes séminifères suite au processus de spermiation.

Les principaux événements de la spermiogénèse sont décrits ci-dessous.

1. *Condensation du noyau et remodelage de la chromatine*

Pendant la spermiogénèse, le matériel génétique paternel est réorganisé et le noyau est hautement condensé. La condensation de l'ADN est importante pour protéger le génome paternel des dommages et des mutations. En même temps, le noyau prend une forme ovoïde, s'allonge et se polarise sur un côté de la cellule. Chez les eucaryotes, les nucléosomes sont des unités structurales de la chromatine. Ils sont formés par des octamères d'histones sur lesquelles sont entouré 147pb d'ADN. Ces octamères d'histones sont composés des histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4. Durant la spermiogénèse, le remodelage de la chromatine entraîne dans un premier temps le remplacement des octamères d'histones canoniques par des variants d'histones spécifiques du testicule. Puis ces variants sont remplacés par les protéines de transition et enfin par les protamines (**Figure 27**). Le remplacement des octamères d'histones permet une condensation importante de la chromatine. Les variants d'histones

Spermiogénèse

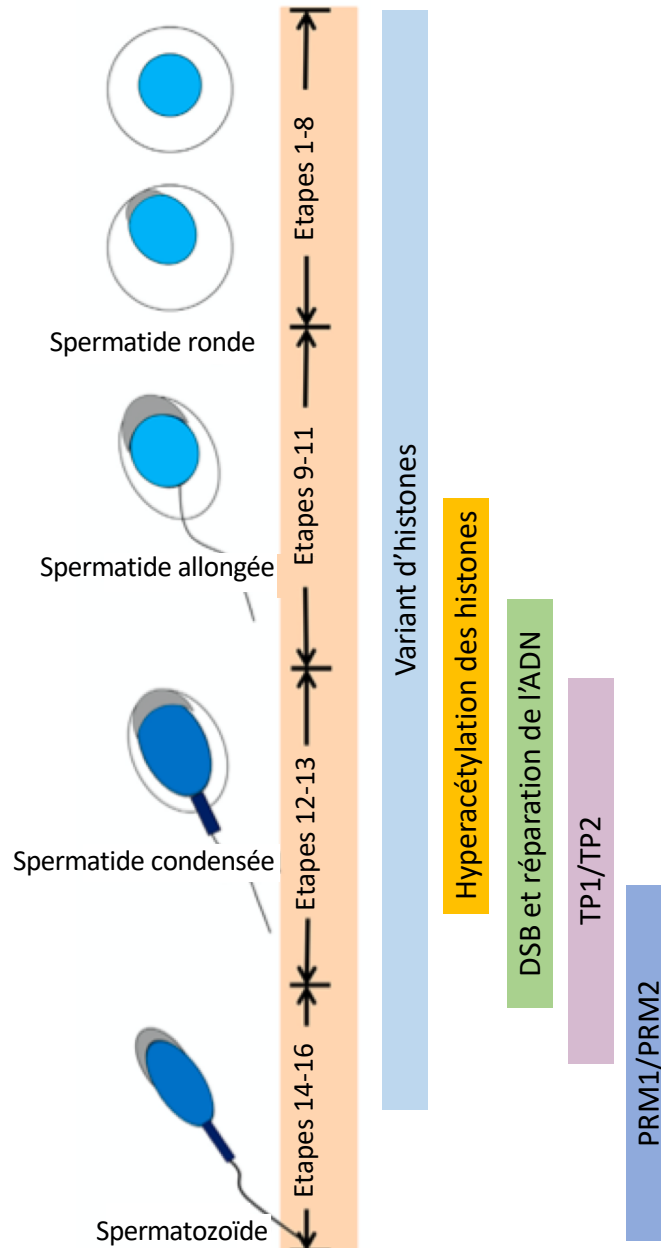


Figure 27 : Les étapes de la spermiogénèse.

La spermiogénèse est divisée en 16 étapes. Durant ces étapes, le remodelage de la chromatine se met en place avec le remplacement des histones canoniques par les variants d'histones spécifiques du testicule. Les variants d'histones rendent les nucléosomes instables favorisant les modifications post-traductionnelles des histones telles que l'hyper-acétylation. Les cassures doubles brins médiées par la Topoisomérase II β favorise le remplacement des variants d'histones par les protéines de transition TP1 et TP2. Enfin les protéines de transition sont remplacées par les protamines PRM1 et PRM2.

Issue de Hao *et al.*, 2019.

sont moins stables que les histones constitutives, ce qui réduit la stabilité des nucléosomes. Les variants de l'histone H1, spécifiques du testicule tels que H1T (pour *testicular H1 histone variant*), H1T2 (appelé aussi HANP1 pour *haploid germ cell-specific nuclear protein 1*) et HILS1 (pour *spermatid-specific linker histone H1-like protein*), sont exprimés uniquement dans les spermatocytes et/ou les spermatides. Chez la souris, la protéine H1T est retrouvée du stade pachytène jusqu'au stade de spermatide allongée; HILS1 est exprimée dans les spermatides allongées (Drabent *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2003). Il a été mis en évidence par immunofluorescence que H1T2 est localisée dans le noyau des spermatides rondes au niveau du pôle apical juste sous l'acrosome (Martianov *et al.*, 2005). Chez la souris, l'inactivation de H1T2 entraîne une diminution de la fertilité uniquement chez le mâle. Ces souris présentent une forte augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux avec des défauts d'élongation et de condensation de l'ADN (Martianov *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005). Le variant d'histone H1T2 joue un rôle important dans la condensation de l'ADN des spermatides.

De même, le double KO des variants d'histones spécifiques du testicule TH2A (nom du gène *Hist1h2aa*) et TH2B (nom du gène *Hist1h2ba*) entraîne des anomalies pendant la spermiogénèse avec des défauts de condensation de la chromatine et la dégénérescence des spermatides entre les stades 10 à 16 de spermiogénèse. De plus, les protéines de transition ainsi que les protamines sont retrouvées en quantité plus faible dans les spermatides double KO comparés aux WT (Shinagawa *et al.*, 2015). Les variants d'histones TH2A et B ont donc un rôle essentiel dans la condensation de la chromatine des spermatides et le remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines. Cette condensation de la chromatine est essentielle pour la formation des spermatozoïdes lors de la spermiogénèse.

Les variants d'histones ont une composition variée en acides aminés (hydrophobes ou hydrophiles) qui sont préférentiellement associés à des états de la chromatine dites répressives ou activatrices. Ces états de la chromatine stabilisent ou déstabilisent les nucléosomes nécessaires pour réguler la transcription du génome paternel en réprimant les gènes somatiques et en activant les gènes spécifiques des spermatides (gènes requis pour la formation de l'acrosome ou du flagelle) (Bao and Bedford, 2016). De plus, les histones spécifiques du testicule subissent des modifications post-traductionnelles au niveau de leur extrémité N-terminale qui facilitent le remodelage de la chromatine et le remplacement des histones. Ces modifications peuvent être des acétylations, des phosphorylations, des méthylation, des SUMOylations et des ubiquitinations.

En plus des modifications post-traductionnelles des histones, la topoisomérase II β crée des DSB au niveau de l'ADN (**Figure 27**). Ces cassures permettent d'éliminer les supers enroulements de l'ADN au niveau des nucléosomes facilitant ainsi le remplacement des variants d'histones spécifiques du testicule par les protéines de transition (Leduc *et al.*, 2008). Ces DSB sont transitoires. Elles sont

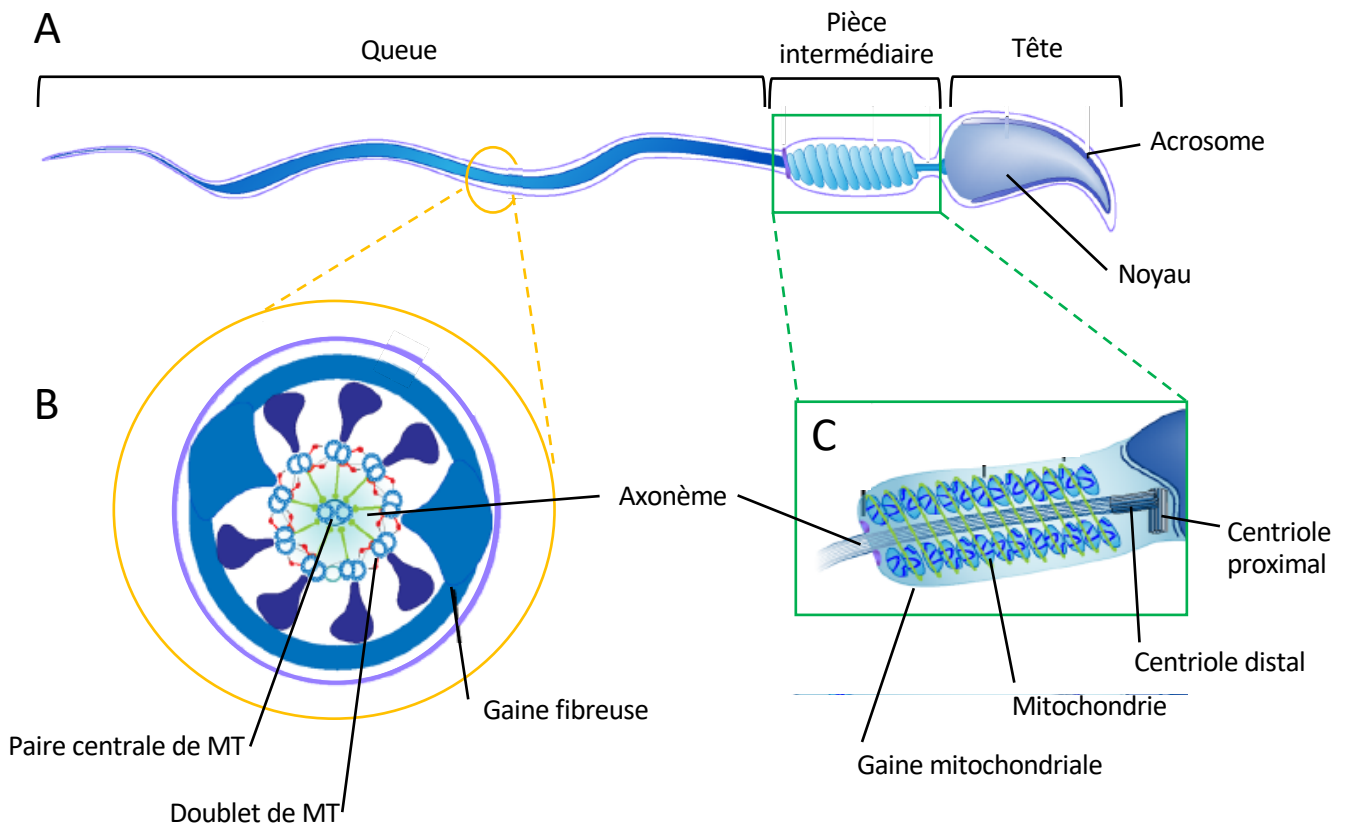


Figure 28 : Représentation schématique d'un spermatozoïde de souris.

(A) Morphologie d'un spermatozoïde mature avec 3 parties distinctes : la tête, la pièce intermédiaire et la queue du spermatozoïde. **(B)** L'élément principal de la queue du spermatozoïde est l'axonème, composé d'une paire centrale de microtubules (MT) entourée par 9 doublets de MT (cercles bleus clairs) assemblés par des bras de Dynéines et des liens de Nexine (rouge). **(C)** La pièce intermédiaire possède une gaine mitochondriale composée de mitochondries assemblées autour de l'axonème sous une forme hélicoïdale. Ces mitochondries permettent la production de l'énergie nécessaire pour les battements du flagelle. Adapté de Dunleavy *et al.*, 2019.

reconnues par les protéines de la famille des polymérase poly(ADP-ribose) nommées PARP1 et PARP2 (pour *poly(ADP-ribose) polymerase 1 et 2*) ainsi que PARG (pour *poly(ADP-ribose) glycohydrolase*). L'action combinée de PARP1 et 2 avec PARG permet la réparation des DSB (Meyer-Ficca *et al.*, 2009). Chez la souris, les mâles *Parg(110)^{-/-}* (délétion du gène *Parg* codant pour la protéine PARG de 110 kDa) présentent une diminution de la fertilité avec une diminution de la taille des portées. Les spermatozoïdes *Parg(110)^{-/-}* montrent une augmentation du nombre de DSB, ainsi qu'un noyau de forme anormal (le noyau ne s'allonge pas). La double délétion *Parp1^{-/-}/Parg(110)^{-/-}* dans les spermatocytes entraîne des défauts d'élongation des noyaux plus prononcés (Meyer-Ficca *et al.*, 2009) et un noyau non compacté. Ainsi, un métabolisme dépendant de *Parp1* et *Parg* est nécessaire pour la réparation des DSB et donc la condensation correcte du noyau dans les spermatides en différenciation.

Les protéines de transitions constituent un intermédiaire pour le remplacement des histones par les protamines. Ces protéines de transition ne sont pas observées dans toutes les espèces sexuées. Par exemple, chez les poissons ou les oiseaux, les histones sont directement remplacées par les protamines (Oliva and Dixon, 1991).

Chez les mammifères, les deux protéines de transition majeures sont TP1 (pour *transition protein 1*) et TP2 (**Figure 27**). TP1 semble stimuler la réparation de l'ADN (Caron *et al.*, 2001) alors que TP2 permettrait la condensation normale de l'ADN des spermatides (Zhao *et al.*, 2001). L'inactivation de *Tnp1* (code pour la protéine TP1) entraîne des anomalies de condensation de la chromatine et des anomalies de motilité des spermatozoïdes avec une diminution de la fertilité chez la souris. Néanmoins, des spermatozoïdes fertiles sont toujours produits. Des niveaux importants de TP2 ont été observés dans les spermatide *Tnp1^{-/-}* (Yu *et al.*, 2000). Ainsi l'absence de TP1 semble être compensée par TP2 pour assurer la production de spermatozoïdes fertiles. L'inactivation de *Tpn2* semble de façon similaire compensée par TP1 (Zhao *et al.*, 2001). Par contre les souris mâles double KO pour *Tnp1* et *Tnp2* sont infertiles avec des défauts majeurs dans la production des spermatozoïdes. Les spermatides présentent un nombre important de DSB ainsi que des défauts de condensation de l'ADN (Zhao *et al.*, 2004). Le double KO a également mis en évidence que les protéines de transition ne sont pas nécessaires pour le déplacement des histones de l'ADN, ni pour le dépôt des protamines (Zhao *et al.*, 2004). Ainsi ces résultats mettent en évidence que les protéines de transition TP1 et TP2 sont essentielles pour la réparation des DSB, la compaction correcte de la chromatine et du noyau des spermatides assurant l'intégrité du génome.

Enfin, les protéines de transition sont remplacées par les protamines (**Figure 27**). Il y a deux types de protamines chez l'homme et la souris nommés PRM1 (pour *Protamine 1*) et PRM2. Cho *et al.* (2001) ont montré que la mutation de l'allèle *Prm1* ou *Prm2* rend les souris infertiles. Les spermatozoïdes *Prm1^{-/-}* ou *Prm2^{-/-}* présentent des anomalies morphologiques ainsi que des altérations

de la chromatine qui n'est pas correctement condensée (Cho *et al.*, 2001). PRM1 et PRM2 sont indispensables pour assurer la compaction correcte de la chromatine dans les spermatozoïdes.

Par rapport aux cellules somatiques, la chromatine dans les spermatozoïdes est six fois plus condensée grâce aux protamines. Cette condensation importante de la chromatine permet de protéger l'intégrité du génome paternel lorsqu'ils sont exposés, par exemple, à des molécules nocives dans le tractus génital féminin (Oliva, 2006).

2. Formation de l'acrosome

Dans les spermatides, l'acrosome est un organite lié à la membrane. Il participe à la fécondation en libérant des enzymes protéolytiques pour faciliter le passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide entourant l'ovocyte, riche en acide hyaluronique. La formation de l'acrosome peut facilement être visualisée en histologie par coloration PAS (**Figure 14**). La forme de l'acrosome et du noyau est différente en fonction des espèces.

Chez la souris, l'acrosome commence à se développer dans les spermatides rondes peu de temps après l'achèvement de la méiose et se propage sur toute la surface nucléaire. La formation de l'acrosome se déroule du stade 2 au stade 12 de la spermiogénèse et peut être divisée en quatre phases appelées : la phase de Golgi, la phase du capuchon, la phase de l'acrosome et la phase de la maturation.

- Durant la phase de Golgi, des vésicules pro-acrosomiques bourgeonnent à partir du réseau trans-Golgien. Ces vésicules sont acheminées vers le noyau où elles se lient et fusionnent entraînant la croissance de l'acrosome à la surface du noyau. La migration des vésicules pro-acrosomiques est médiée par les microtubules. La perturbation de l'organisation des microtubules, avec à un traitement à la Colchicine des tubes séminifères en culture, entraîne la dépolymérisation des microtubules. Cette perturbation durant la spermiogénèse affecte la structure de l'appareil de Golgi et empêche la formation correcte de l'acrosome (Huang and Ho, 2006). La dynamique des microtubules est donc nécessaire pour la biogenèse de l'acrosome médiée par le trafic vésiculaire de l'appareil de Golgi.
- Lors de la phase du capuchon, l'appareil de Golgi trie et achemine les vésicules vers la surface nucléaire pour permettre à l'acrosome de croître. Celui-ci s'élargit et se répand sur la membrane nucléaire (Kierszenbaum *et al.*, 2011). Une structure appelée l'acroplaxome (structure d'actine F, myosine et kératine) facilite l'agrégation et l'attachement de la vésicule acrosomique en croissance sur le noyau. L'acroplaxome stabilise aussi l'acrosome durant sa biogenèse (Kierszenbaum *et al.*, 2003). Lors de sa croissance, l'acrosome est d'abord appelé la vésicule acrosomale puis le sac acrosomique.

- La phase de l'acrosome se caractérise par la formation d'une membrane acrosomale externe et interne respectivement située du côté de la membrane plasmique et de l'enveloppe nucléaire.
- Enfin, l'acrosome prend sa forme définitive durant la phase de maturation.

L'absence de formation de l'acrosome est retrouvée chez l'homme dans les cas de globozoospermie et impacte la fertilité (Dam *et al.*, 2007). Chez ces individus, les spermatozoïdes ont une forme arrondie, un noyau rond sans acrosome et présentent des défauts secondaires liés au cytosquelette (Dam *et al.*, 2007). Chez ces patients infertiles, l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes directement dans l'ovocytes *in vitro* (ICSI) a permis d'aboutir à des grossesses menées à terme avec des enfants sains (Liu *et al.*, 1995). Ainsi, l'acrosome semble seulement nécessaire pour la fécondation de l'ovocyte.

3. Formation du flagelle

Le flagelle est une unité fonctionnelle qui permet au spermatozoïde de devenir motile pour atteindre l'ovocyte dans le tractus génital féminin. La formation du flagelle est initiée avec l'assemblage de l'axonème au début de la spermiogénèse, puis son élongation se poursuit des stades 8 à 14 de la spermiogénèse. Les structures accessoires qui s'assemblent durant l'élongation sont la gaine mitochondriale, les fibres denses externes et la gaine fibreuse (**Figure 28**).

Dans les spermatides, le centriole mère est renommé le centriole distal car il est éloigné du noyau. Le centriole fille est renommé le centriole proximal puisqu'il est proche du noyau (Avidor-Reiss and Fishman, 2019). Le centriole fille va s'attacher à la membrane nucléaire grâce à une structure appelée l'appareil d'attelage tête queue (*head-tail coupling apparatus*). Récemment, il a été montré que la protéine SUN5 (membre de la famille des protéine SUN) est impliquée dans l'encrage tête-queue des spermatozoïdes. L'inactivation de *Sun5* chez la souris entraîne une infertilité uniquement chez le mâle. Les spermatozoïdes issus de l'épididyme sont anormaux : la tête des spermatozoïdes est séparée du flagelle (Shang *et al.*, 2017). Ces résultats mettent en évidence que SUN5 est indispensable pour l'accrochage de la tête du spermatozoïde au flagelle en formation.

En parallèle, le centriole distal subit des remodelages et permet l'assemblage de l'axonème (**Figure 28B-C**). L'axonème est composé d'une paire de microtubules centraux entourés de 9 doublets de microtubules. Les doublets de microtubules voisins sont liés entre eux par des dynéines et des nexines (Ishikawa, 2017). L'hydrolyse de l'ATP met en mouvement les bras de dynéines : ces mouvements entraînent le glissement des doublets de microtubules les uns par rapport aux autres et permettent les mouvements du flagelle. Un nombre important de modèle de souris KO a mis en évidence des anomalies spécifiques au niveau de la structure du flagelle entraînant un défaut de

motilité des spermatozoïdes et une infertilité mâle (Escalier, 2006). Par exemple, la protéine Tektin-t, conservée chez les mammifères, est exprimée spécifiquement dans les spermatides et forme des protofilaments de tubuline α et β localisés dans les axonèmes du flagelle. Les souris mâles invalidées pour Tektin-t présentent des spermatozoïdes avec une motilité anormale et sont stériles. Les analyses par microscopie électronique ont mis en évidence des anomalies de formation des bras de dynéines dans les flagelles (Tanaka *et al.*, 2004). Ainsi, Tektin-t est indispensable pour la formation des bras de dynéines dans le flagelle des spermatozoïdes et l'intégrité des bras de dynéines est nécessaire pour la motilité du flagelle.

L'énergie, disponible sous forme d'ATP et nécessaire au niveau des bras de dynéines, provient de la gaine mitochondriale qui caractérise la pièce intermédiaire du spermatozoïde (**Figure 28C**). Les mitochondries présentes dans les spermatides rondes migrent vers la pièce intermédiaire, puis elles s'allongent et s'assemblent entre elles autour de l'axonème sous une forme hélicoïdale pour former la gaine mitochondriale. Des gènes de type glycérol kinase appelés *Gykl1* (pour Glycérol kinase-like 1) ou *Gk2* (pour Glycérol kinase 2) sont localisés spécifiquement dans les mitochondries des spermatides (Chen *et al.*, 2017). L'inactivation de *Gykl1* ou *Gk2* chez la souris entraîne une infertilité uniquement chez les mâles. Ces souris produisent des spermatozoïdes anormaux avec des défauts au niveau de la gaine mitochondriale et des mitochondries. La queue des spermatozoïdes est également défectueuse (Chen *et al.*, 2017). Ainsi ces gènes ont un rôle primordial dans la morphologie et l'arrangement mitochondrial de la gaine mitochondriale ainsi que dans le maintien de l'intégrité de la queue des spermatozoïdes.

Enfin, la manchette se met en place de façon transitoire du stade 7 à 14 au niveau de la base du noyau. Cette structure en forme d'anneau est nécessaire pour le rayonnement des faisceaux de microtubules formant le manteau de la manchette (Kierszenbaum and Tres, 2004). Les microtubules issus de la manchette entourent également le noyau pour exercer une pression et lui donner sa forme caractéristique (Russell *et al.*, 1991).

Les souris mâles mutantes *azh* (pour *abnormal sperm head-shape*) ont une spermiogénèse altérée: les spermatides et spermatozoïdes présentent un flagelle enroulé en forme de lasso avec une fréquence élevée de dislocation de la tête d'où une morphologie anormale (Mochida *et al.*, 1999). Il a été mis en évidence que le gène *Hook1* (pour *hook microtubule tethering protein 1*) est tronqué chez les souris *azh* et serait responsable des anomalies observées des spermatides (Mendoza-Lujambio *et al.*, 2002). La protéine HOOK1 joue un rôle au niveau des structures des microtubules dans la connexion de la manchette et du flagelle, au niveau de la tête des spermatozoïdes et dans la stabilisation de ces structures. La mutation de *Hook1* entraîne un positionnement anormal des microtubules le long de la membrane plasmique avec une forme anormale de la tête des spermatozoïdes et une fixation fragile

du flagelle à la tête des spermatozoïdes (Mendoza-Lujambio *et al.*, 2002). L'organisation et le positionnement des microtubules de la manchette et du flagelle sont indispensables pour assurer la liaison de la tête avec le reste du spermatozoïde.

4. Réduction cytoplasmique

La forme compact et mince des spermatozoïdes est assurée par une élimination du cytoplasme en excès et est nommée la réduction cytoplasmique. Les complexes tubulobulbaires (ou TBC) sont des protubérances cytoplasmiques au niveau de la tête des spermatides qui relient les spermatides aux cellules de Sertoli. Ces TBC sont tapissés de filaments d'actine-F dont la dynamique est régulée par la protéine CAPZA3 (Capping actin protein of muscle Z-line subunit alpha 3) (Jan *et al.*, 2012). Chez la souris, une mutation faux sens dans le gène *Capza3* empêche l'élimination de l'excès de cytoplasme des spermatides ainsi qu'une désorganisation du flagelle. L'absence de CAPZA3 perturbe la structure et la dynamique de l'actine-F (Geyer *et al.*, 2009). Ainsi, les TBC sont indispensables pour l'élimination de l'excès de cytoplasme des spermatides vers les cellules de Sertoli (Jan *et al.*, 2012).

5. Spermiation

La spermiation permet aux spermatides allongées d'acquérir une morphologie de spermatozoïdes et d'être relâchées dans la lumière des tubes séminifères. Au début de la spermiation, le cytoplasme des spermatides est retrouvé au niveau du flagelle. Toute la structure de la spermatide est largement enveloppée par la cellule de Sertoli (**Figure 29**). Celle-ci établit un contact étroit avec la tête des spermatides au niveau de jonctions spécialisées appelées spécialisations ectoplasmiques (SE). Elles permettent la translocation des spermatides à travers l'épithélium séminifère. Ce sont des surfaces de contact importantes favorisant les échanges entre les spermatides et la cellule de Sertoli durant l'élongation (Revue : Vogl *et al.*, 2000).

La spermiation commence lorsque la majorité des spermatides allongées sont alignées le long du bord luminal de l'épithélium séminifère. Les cellules de Sertoli se rétractent jusqu'à ce qu'elles soient en contact seulement avec la tête des spermatides (**Figure 29**). Durant ce processus, une partie des SE est désassemblées et remplacées par les TBC. Ils se forment au niveau de la tête de la spermatide toujours en contact avec la cellule de Sertoli (**Figure 29**). Les TBC sont associés à la tête de la spermatide au niveau de la membrane plasmique recouvrant l'acrosome et relie les spermatides à la cellule de Sertoli. En vue de la libération des spermatides dans les tubes séminifères, des ampoules internalisent les jonctions d'adhésions dont les SE encore présentes au niveau de la tête des spermatides (Guttman *et al.*, 2004; Vogl *et al.*, 2013). Ces ampoules forment de larges vésicules puis fusionnent avec les lysosomes pour être dégradées par les cellules de Sertoli (Vogl *et al.*, 2013). Enfin, les TBC disparaissent lorsque les spermatides sont relâchées dans la lumière du tube séminifère : ce

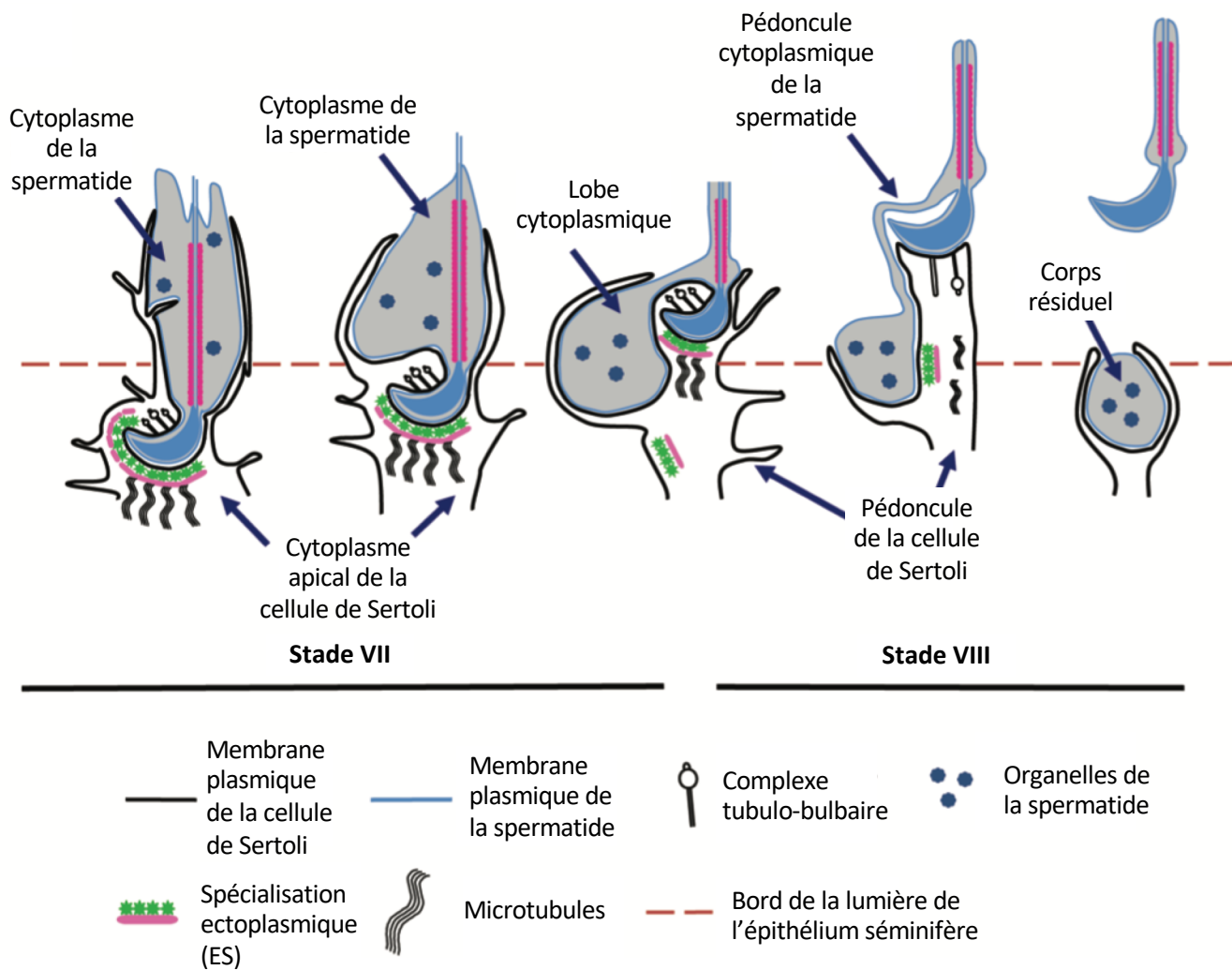


Figure 29 : Schéma des étapes de spermiation.

Lors de l'initiation de la spermiation (stade VII), le flagelle des spermatides est entouré de cytoplasme et il est enveloppé dans les projections des cellules de Sertoli. Les complexes tubulo-bulbaires (TBC) sont présents sur la tête des spermatides, aux endroits dépourvus de spécialisations ectoplasmiques (ES). Puis le cytoplasme des spermatides recule progressivement au cours de la spermiogénèse jusqu'à être en contact avec la tête au stade VIII. Le pédoncule de la cellule de Sertoli pousse les spermatides vers la lumière du tube séminifère. Le cytoplasme des spermatides se condense et reste dans l'épithélium séminifère et se situe sous la tête de la spermatide et constitue le lobe cytoplasmique. Au cours de la progression du stade VII vers le stade VIII, les ES à proximité de la tête du spermatide disparaissent. Les TBC initialement présents au niveau de la face ventrale de la tête des spermatides du stade VII sont en suite visibles au niveau de la face dorsale au stade VIII. Le désengagement de la tête du spermatide de la cellule de Sertoli marque la fin de la spermiation. Le cytoplasme capturé au niveau de la cellule de Sertoli est appelé le corps résiduel et est phagocyté par les cellules de Sertoli.

Issue de O'Donnell *et al.*, 2011.

processus est appelé le désengagement. Les spermatides sont alors appelées des spermatozoïdes. Lors du désengagement, le cytoplasme des spermatides se condense et reste dans l'épithélium séminifère : les cellules de Sertoli gardent le cytoplasme des spermatides, alors appelé corps résiduel, et le phagocytent.

Ainsi le processus de spermiation, long et complexe, est essentiel pour la fertilité d'un individu en déterminant la quantité de spermatozoïdes libérés dans la lumière des tubes séminifères pour rejoindre l'épididyme. Ces spermatozoïdes n'ont pas encore acquis un mouvement progressif et ils ne sont pas encore capables de féconder l'ovocyte.

E. La maturation post-testiculaire des spermatozoïdes

Après le désengagement, le courant présent dans la lumière des tubes séminifères (produit par l'écoulement des fluides sécrétés par les cellules de Sertoli) emporte les spermatozoïdes qui vont rejoindre l'épididyme. Ceux-ci sont alors fonctionnellement immatures et vont subir des modifications biochimiques et physiologiques durant leur trajet dans les voies génitales masculines (dans l'épididyme principalement) puis dans les voies génitales féminines avant d'atteindre l'ovocyte à féconder.

1. Le transit épididymaire : la fonction de l'épididyme

Durant leur trajet dans l'épididyme, les spermatozoïdes vont subir de nombreuses modifications cellulaires permettant la disparition des gouttelettes cytoplasmiques, l'acquisition de la mobilité progressive et la capacité de participer aux interactions cellulaires nécessaires pour la fécondation. Cette maturation épididymaire rend les spermatozoïdes capables d'atteindre, de reconnaître et de fusionner avec le gamète femelle. L'épididyme assure également la survie et la protection des spermatozoïdes.

a. L'épididyme

L'épididyme est un tube unique enroulé qui connecte les canaux efférents au canal déférent (**Figure 30**). Il peut être divisé en 3 segments anatomiques successifs appelés la tête, le corps et la queue qui sont séparés par des cloisons conjonctives ou septa. L'épididyme a une longueur estimée à 6m chez l'homme et 1,5m chez la souris. Selon les espèces, il faut entre 1 et 2 semaines à un spermatozoïde pour traverser l'épididyme (Belleannée *et al.*, 2012). L'épididyme est formé d'un épithélium pseudo-stratifié qui assure la sécrétion et la réabsorption des fluides épididymaires régulant sa composition en fonction des régions du tube. Chacun de ces segments de l'épididyme présente un environnement spécifique avec des concentrations en ions ainsi qu'une expression des gènes spécifiques essentiels pour les différentes étapes de la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes (Belleannée *et al.*, 2012; Nixon *et al.*, 2019). Les sécrétions de la tête et du corps de

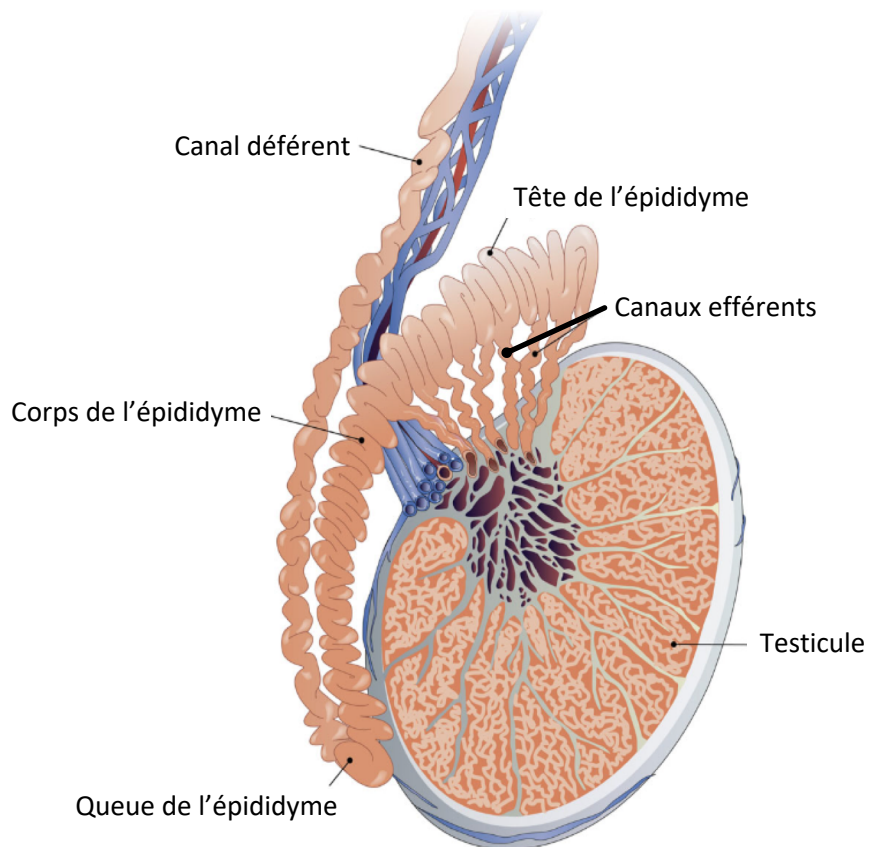


Figure 30 : Schéma de l'épididyme sur une coupe transversale d'un testicule.
Issue de Bellannée *et al.*, 2012.

l'épididyme agissent sur la mobilité et les capacités de fécondation des spermatozoïdes alors que les sécrétions dans la queue de l'épididyme (qui est la zone de stockage des spermatozoïdes entre deux éjaculations) préservent la fertilité des spermatozoïdes (Jones and Murdoch, 1996; Turner, 1995). L'épididyme possède une barrière hémato-épididymaire qui protège les spermatozoïdes contre le système immunitaire (Pöllänen and Cooper, 1994). Enfin, l'épididyme présente des fonctions de réabsorption des ions, des protéines et de l'eau afin de concentrer les spermatozoïdes.

b. Remodelage du contenu spermatique

Les spermatozoïdes ne sont pas actifs au niveau de leur transcription et de leur traduction (Aitken *et al.*, 2007). Ainsi les protéines nécessaires pour la survie et la maturation des spermatozoïdes sont produites par l'épididyme et incorporées dans les spermatozoïdes (Gervasi and Visconti, 2017). Ces spermatozoïdes présentent donc des changements dans le contenu en protéine, lipide et sucre durant leur transit épididymaire. Les épididymosomes seraient la voie principale permettant le transfert des protéines de l'épididyme aux spermatozoïdes (Sullivan and Saez, 2013). Néanmoins, il n'est pas exclu que les cellules sécrétoires de l'épididyme relâchent des molécules solubles dans le fluide épididymaire (sécrétion apocrine) destinées aux spermatozoïdes (Rejraji *et al.*, 2006; Sullivan and Saez, 2013).

Durant le transit au niveau de la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes présentent des pertes aqueuses entraînées par des mouvements d'ion et d'eau. Cette perte aqueuse entraîne une diminution plus importante du volume de la tête spermatique (Noblanc *et al.*, 2012). De plus, la formation de ponts disulfures entre les protamines accentue la compaction de la tête spermatique. Par exemple, la protéine GPx4 (pour *Glutathione peroxidase 4*) est stockée dans les noyaux des spermatozoïdes et produite au cours de la spermatogenèse. Elle est associée aux protamines et assure la formation des ponts disulfures lors du passage des spermatozoïdes dans la tête de l'épididyme. L'environnement de l'épididyme apporte les éléments nécessaires pour l'activité de GPx4 tels que H₂O₂. L'invalidation de l'expression de *Gpx4* nucléaire n'a pas d'effet sur la fertilité des souris. Néanmoins, l'étude des spermatozoïdes mutés a mis en évidence des défauts de condensation du noyau entraînant une morphologie anormale de la tête spermatique (Conrad *et al.*, 2005). La protéine GPx4 nucléaire permet la condensation du noyau spermatique grâce à l'environnement spécifique de l'épididyme. Cette condensation accrue de la tête spermatique protège davantage le génome paternel des agressions extérieures et permet aux spermatozoïdes d'acquies une vitesse maximale (Noblanc *et al.*, 2012).

D'un point de vue morphologique, le changement le plus visible sur les spermatozoïdes est la migration de la gouttelette cytoplasmique du col jusqu'à la pièce intermédiaire puis son expulsion (Cooper, 2011; Xu *et al.*, 2013). Cette gouttelette cytoplasmique est un reste du cytoplasme des

spermatides qui n'a pas été éliminé durant la spermiation. Dans l'épididyme, ces gouttelettes cytoplasmiques interagissent avec les épидидyosomes (Păunescu *et al.*, 2014). Chez le singe et la souris, il a été mis en évidence que la majorité des spermatozoïdes avec des gouttelettes cytoplasmiques ont une certaine motilité alors que les spermatozoïdes sans gouttelette sont moins motiles (Xu *et al.*, 2013). Des analyses protéomiques des gouttelettes cytoplasmiques de souris ont montré que ces structures sont fortement enrichies en enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique nécessaire pour l'activation des mitochondries et la production d'ATP (Yuan *et al.*, 2013). Ainsi, les gouttelettes lipidiques joueraient un rôle dans le début de l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes lors du transit épидидymaire.

La maturation épидидymaire des spermatozoïdes passe par des changements moléculaires de leur surface membranaire. Une structure particulière appelé le glycocalyx se forme : c'est une surface d'échange entre le spermatozoïde et son environnement composé de glycoprotéines et de polysaccharides. Cette structure est essentielle lors du transit des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin puisqu'il empêche la capacitation prématurée des spermatozoïdes, masque les protéines impliquées dans la fertilisation et protège les spermatozoïdes du système immunitaire de la femelle (Teclé and Gagneux, 2015).

L'homéostasie lipidique de la membrane plasmique est également modifiée : pour la majorité des espèces, les spermatozoïdes voient le ratio cholestérol/lipides diminuer au cours de leur maturation (voir la revue Saez *et al.*, 2011). En effet, la proportion de phospholipides insaturés dans la membrane plasmique augmente, alors que le taux de cholestérol des spermatozoïdes diminue au cours du transit épидидymaire. Ces modifications augmentent la fluidité de la membrane des spermatozoïdes. La fluidité de la membrane est un élément essentiel pour la fertilisation lors de la réaction acrosomique.

Ainsi, lors du transit dans l'épididyme, les spermatozoïdes interagissent avec des structures vésiculaires (tels que les épидидyosomes) et subissent des modifications assurant la survie ainsi que l'acquisition de la motilité. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes sont motiles mais ne sont pas encore capables de fertiliser l'ovocyte.

2. Transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle : la capacitation

Les spermatozoïdes éjaculés dans le tractus génital féminin vont migrer pour rejoindre l'ovocyte à féconder. Pendant la migration, les spermatozoïdes subissent un ensemble de modifications biochimiques et membranaires : ces événements sont appelés la capacitation. Ces modifications sont nécessaires pour permettre aux spermatozoïdes de devenir féconds. Je ne détaillerai pas cette partie, ne faisant pas référence aux travaux de cette thèse.

III. Les ARNs non codants (ARNnc) :

Le génome code pour des gènes codant pour des protéines. De plus, certains gènes sont transcrits en ARN qui ne seront jamais traduits : ce sont des ARNs non-codants (ARNnc). Les ARNnc sont présents chez une grande diversité d'espèce : les procaryotes (avec moins de 25% d'ADN non-codant (ADNnc)), les eucaryotes (entre 25 et 50% d'ADNnc), les plantes, les champignons, les animaux (plus de 50% d'ADNnc) et les hommes (environ 98.5% d'ADNnc) (Zhang *et al.*, 2016). Plus un organisme est complexe, plus la proportion d'ADNnc et donc d'ARNnc est importante. Chez l'homme, seulement 2% du génome transcrit code pour des protéines. D'abord considérés comme un bruit de fond transcriptionnel ou comme des ARNs indésirables, ces ARNnc possèdent en fait des rôles de régulation critiques dans divers réseaux moléculaires.

Les ARNncs ont été divisés en deux catégories principales en fonction de leurs tailles. Les petits ARNnc ont une taille comprise entre 18 et 200 nucléotides alors que les ARNs non-codant longs (lncARN) ont une taille supérieure à 200 nucléotides. Ces deux groupes principaux sont subdivisés en sous-groupes.

A. Les petits ARNs non codants

Parmi les petits ARNs, il y a les ARNs de ménage ou structurels et les ARNs régulateurs. Les ARNs structurels comprennent les ARNs ribosomiaux (ARNr), les ARNs de transfert (ARNt), les petits ARNs nucléaires (snRNA pour *small nuclear RNA*) et les petits ARNs nucléolaires (snoRNAs pour *small nucleolar RNAs*) : ils ont des rôles dans des processus essentiels comme l'épissage et la traduction. Ces ARNs ne seront pas décrits dans ce rapport. Les ARNs régulateurs comprennent les microARNs (miARN), les ARNs interagissant avec les piwi (piARN) et les petits ARNs dérivés des tARN (tRFs pour *t-RNA derived small RNA*). Ceux-ci régulent l'expression des gènes, et jouent des rôles physiologiques essentiels. Ils peuvent également être retrouvés dans des processus pathologiques.

1. Les microARNs (miARN) :

Les miARNs sont présents dans les cellules eucaryotes. Ils sont très conservés avec une taille comprise entre 18 et 25 nucléotides. La formation des miARNs matures est un processus complexe (revue : Ha and Kim, 2014). Cela commence par la transcription dans le noyau d'un précurseur de miARN primaire (pri-miARN) par l'ARN polymérase II. Ces pri-miARNs possèdent une coiffe en 5', une queue poly(A) en 3' et une structure en épingle à cheveu. Toujours dans le noyau, les pri-miARNs sont pris en charge par le complexe composé de l'ARN polymérase III, nommée Drosha, et la protéine de liaison à l'ARN, DGCR8, pour être clivés (Han *et al.*, 2004). Une fois clivés, les pri-miARN alors appelés

précurseur des miARNs (pré-miARN) ont une forme en épingle à cheveux. Ces pré-miARNs sont reconnus et exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5 (EXP5) où ils seront clivés par l'endonucléase RNase Dicer (Hutvagner, 2001; Yi *et al.*, 2003). Le clivage des pré-miARNs forment des duplexes de miARNs avec un brin principal fonctionnel et un brin passager. Le brin passager sera dégradé suite à l'attachement aux protéines de liaison de la famille Argonaute (AGO). Le brin fonctionnel sera pris en charge par le complexe RISC (pour *RNA induced silencing complex*) (**Figure 31**). Le miARN guidera le complexe RISC au niveau de séquences complémentaires pour induire le silençage traductionnel, dégrader des ARNm cibles (revue : Bartel, 2004) ou à l'inverse favoriser la traduction des ARNm (Ørom *et al.*, 2008; Vasudevan *et al.*, 2007).

L'expression de miARNs exogènes dans des cellules de mammifère a mis en évidence leurs rôles dans la régulation de la transcription. Par exemple, la tranfection du miR124 (préférentiellement exprimé dans le cerveau) ou du mir-1 (préférentiellement exprimé dans les muscles) change le profil d'expression des cellules en culture vers le profil d'expression du tissu d'origine des miARNs exogènes. Les miARNs régulent à la baisse l'expression des ARNm cibles en fixant leur extrémité 5' au site 3'UTR des ARNm (Lim *et al.*, 2005). Ainsi les miARNs répriment l'expression de différents gènes, ce qui favorise l'expression des gènes spécifiques à un tissu (le cerveau pour miR124 et les muscles pour mir-1). D'autres expérimentations à partir de cultures cellulaires ont mis en évidence que la fonction des miARNs varie en fonction du cycle cellulaire. Par exemple, lorsque les cellules HEK293 en culture sont en prolifération avec un niveau de sérum suffisant, les miARNs répriment la transcription. A l'inverse, lorsque les cellules manquent de sérum, les TNF α AREs (pour *AU-rich elements*) sont capables de recruter les miRNA369-3 pour permettre la régulation à la hausse de la traduction et réprimer la prolifération des cellules. Le miRNA369-3 agit en recrutant le complexe AGO-FXR1 qui est un activateur de la traduction (Vasudevan *et al.*, 2007). Ces résultats donnent un exemple que les miARNs peuvent également moduler leur rôle en fonction des besoins de la cellule et du cycle cellulaire.

L'invalidation de la machinerie de production des miARNs a mis en évidence le rôle essentiel de ces petits ARNs lors du développement des cellules germinales. L'invalidation conditionnelle de Dicer spécifiquement dans les cellules germinales murines à partir de 10 *jpc* entraîne une diminution de la prolifération et donc du nombre de CGP dans les gonades mâles à 13,5 *jpc* par rapport au WT (Hayashi *et al.*, 2008). A l'âge adulte, ces souris sont infertiles. Des cellules germinales sont présentes dans le testicule mais seuls quelques tubes séminifères possèdent des spermatozoïdes allongés. Ceux-ci présentent une morphologie et une motilité anormales (Hayashi *et al.*, 2008; Maatouk *et al.*, 2008). Ces études montrent que Dicer, enzyme intervenant dans la production des miARNs mature, est indispensable pour le bon déroulement de la spermatogenèse, garantissant ainsi la fertilité des individus.

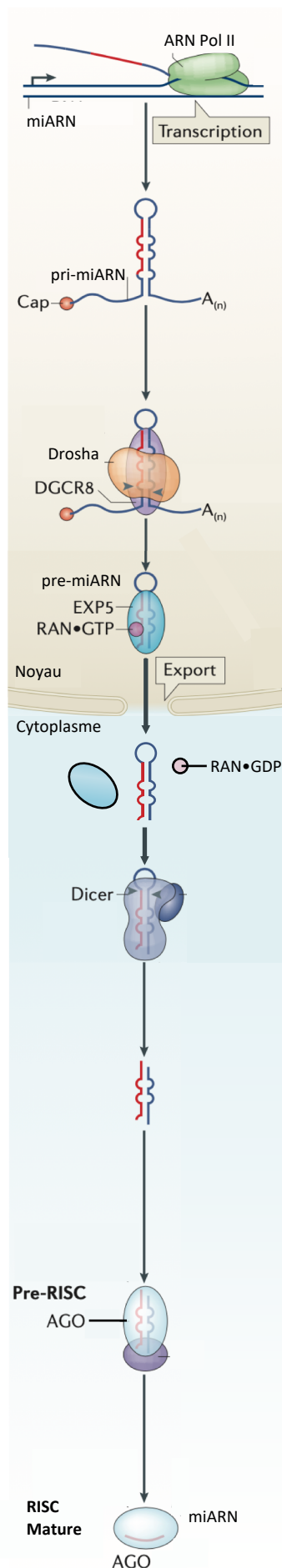


Figure 31 : Biogenèse des miARNs.

Les gènes codant pour les miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II (ARN Pol II). L'ARN synthétisé, pri-miARN (précurseur primaire des miARNs), possède une structure en épingle à cheveux. Le pri-miARN est pris en charge et clivé par l'ARN Pol III (Drosha) et DGCR8 et devient un pré-miARN (précurseur des miARN).

Les pré-miARNs sont exportés du noyau par le complexe EXP5 (exportine 5)/RAN•GTP. L'ensemble se dissocie dans le cytoplasme et le pré-miARN est pris en charge et clivé par Dicer avant d'être relâché sous forme de duplex de miARNs (avec un brin passager en bleu et un brin fonctionnel en rouge).

Le complexe RISC (composé de la protéine AGO) prend en charge les duplex de miARNs et dégrade le brin passager. Le miARN est alors mature.

Adaptée de Ha et Kim, 2014

Pendant la spermatogenèse des mammifères, des corps chromatoïdes se forment dans les spermatides rondes post-méiotiques. Kotaja *et al.* (2006) ont mis en évidence la relation physique entre ces corps chromatoïdes et la machinerie de production des miARN. En effet, Dicer ainsi que des composants du complexe RISC se localisent au niveau de ces corps chromatoïdes. Plus précisément, Dicer interagit avec MVH (Ddx4, homologue de VASA) située dans les corps chromatoïdes (Kotaja *et al.*, 2006). Ces résultats appuient le rôle des miARN durant la spermatogenèse et plus précisément sur le contrôle de la différenciation des spermatides rondes.

2. Les Piwi-ARN (piARN)

Les piARNs (pour *Piwi interacting RNA*) sont une autre classe de petits ARNnc avec une taille comprise entre 26 et 31 nucléotides. Ils interagissent avec les protéines PIWI (pour *P-element induced wimpy testis in Drosophila*) qui sont une sous famille des protéines de la famille ARGONAUTE. Les protéines PIWI sont exprimées uniquement dans les gonades et s'associent avec les piARNs pour réprimer l'expression des séquences répétées.

Ces séquences répétées appelées éléments transposables ou rétrotransposons peuvent altérer l'organisation du génome en amplifiant ou en transposant du matériel génétique aléatoirement dans le génome. Sans contrôle, ces séquences peuvent créer des mutations dans le génome et perturber son fonctionnement. Dans un organisme sain, une répression épigénétique des éléments rétrotransposables est exercée grâce à la méthylation de l'ADN au niveau des CpG. Néanmoins, des reprogrammations épigénétiques se produisent durant la vie d'un individu entraînant la libération transitoire de l'ADN de ces marques épigénétiques. Les phénomènes de reprogrammation épigénétique avec une déméthylation globale sont observés durant deux périodes du développement chez les mammifères dont la première a lieu durant le développement pré-implantatoire du zygote (Lane *et al.*, 2003). Puis des méthylations *de novo* se produisent au moment de l'implantation de l'embryon et perdureront dans les cellules somatiques tout au long de la vie de l'individu. Seules les cellules germinales initient à nouveau une phase de déméthylation globale de l'ADN lors de leur migration dans les crêtes génitales (complète vers 12,5 *jpc* chez la souris) (Popp *et al.*, 2010). Cette déméthylation de l'ADN enlève les marques d'inhibition présentes au niveau des éléments transposables. Puis, la méthylation *de novo* des cellules germinales diffère selon les sexes. Chez la souris, les gamètes femelles acquerront leur méthylation après la naissance, lors de la croissance des ovocytes, soit entre 10 et 25 *jpp*. Chez le mâle, les pro-spermatogonies commencent leur reméthylation *de novo* après 14,5 *jpc* pour atteindre un niveau de méthylation maximal après la naissance au stade pachytène de méiose I (Kato *et al.*, 2007; Oakes *et al.*, 2007).

Les piARNs sont retrouvés dans les gonades d'un nombre important d'espèces comme la drosophile, la souris, les ruminants et l'homme (Ha *et al.*, 2014; Juliano *et al.*, 2011; Saito, 2006). Dans ces espèces, les piARNs en interaction avec les protéines PIWI jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des éléments transposables et leurs répressions dans les cellules germinales. Contrairement à leur voie de biogenèse, les séquences de ces piARNs ne semblent pas conservées entre les espèces. Chez la souris, 3 protéines PIWI sont exprimées dans les cellules germinales : MIWI (homologue humain : PIWIL1), MILI (PIWIL2) et MIWI2 (PIWIL4) (**Figure 32**). Ces protéines PIWI sont indispensables pour la fertilité chez les souris mâles (Carmell *et al.*, 2007; Deng and Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa, 2004). L'invalidation de *Mili* (*piwil2*) ou *Miwi2* (*piwil4*) montre que ces protéines ont un rôle précoce durant la méiose des spermatocytes : le phénotype observé est un blocage des cellules germinales en prophase I de méiose. L'invalidation de *Miwi* (*piwil1*) fait apparaître un phénotype plus tardif avec un arrêt de maturation dans les spermatides rondes. Les phénotypes d'infertilité observés dans ces études sont dépendants de l'activation des éléments transposables dû à l'absence des protéines PIWI. Ces retrotransposons entraînent une instabilité du génome ayant pour conséquence l'arrêt de la méiose des cellules germinales puis une perte de ces cellules.

Les piARNs s'associent par complémentarité à leurs ARN messagers cibles (retrotransposons) pour les réprimer. Les piARNs interagissent étroitement avec les protéines PIWI qui sont ainsi recrutées sur les ARNm cibles. Ces régulations par les piARNs ont été bien décrites chez la drosophile (Brennecke *et al.*, 2007) puis dans différentes espèces. Chez la souris, dans les cellules germinales mâles, les complexes PIWI-piARN, comprenant les protéines MILI et MIWI2, montrent un rôle dans la méthylation des îlots CpG permettant la répression des rétrotransposons (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2008). Dans ces cas-là, les piARN jouent le rôle de guide pour cibler les séquences ADN à méthyler.

La biogenèse des piARN est se fait par deux mécanismes : la voie de traitement primaire des piARN et la voie d'amplification dite "ping-pong". La voie de traitement primaire des piARN permet la formation d'un pool de piARNs qui cible plusieurs éléments transposables. Puis la voie d'amplification "ping-pong" accroît les piARNs qui ciblent les rétrotransposons actifs (voir la revue Czech *et al.*, 2018).

3. Fragments dérivés des ARNt :

Les ARNs de transfert (ARNt) sont des petits ARNs de 70-90 nucléotides essentiels pour la machinerie de traduction : ils permettent l'apport des acides aminés aux ribosomes. Les fragments dérivés des ARNt ou tRF (pour *tRNA-derived RNA fragments*) sont des ARNt matures ou précurseurs ayant subi un traitement précis à leur extrémité 5' ou 3'. Il a été mis en évidence 3 sous classes majeures de fragments dérivés de ARNt comprenant les tRF-5, tRF-3 et tRF-1. Les tRF-3 et 5 sont générés à partir d'ARNt matures qui sont clivés par des endonucléases et digérés pas des exonucléases (**Figure 33**). Les

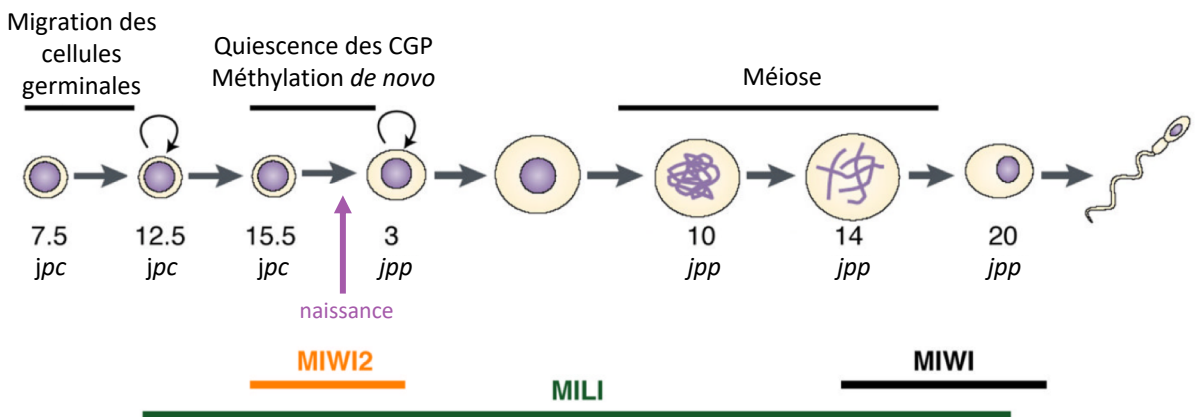


Figure 32 : Expression des protéines PIWI au cours du développement des cellules germinales mâles chez la souris.

Après la migration, les cellules germinales primordiales arrivent dans la gonade mâle vers 11,5 jpc et se développent avant de subir un arrêt du cycle cellulaire à 15,5 jpc coïncidant avec l'établissement de la méthylation de novo de l'ADN sur les éléments transposables et les gènes imprimés. C'est à ce moment que la protéine MIWI2 (PIWIL4) est présente puis disparaît avec la reprise des divisions mitotiques à environ 3 jpp. La méiose est initiée à 10 jpp. La protéine MIWI (PIWIL1) est exprimée dans les premiers spermatocytes pachytènes (à 14 jpp) jusqu'aux spermatides ronds haploïdes (20 jpp). La protéine MILI (PIWIL2) est présente dès 12,5 jpc jusqu'à la méiose des cellules germinales.

Issue de Aravin *et al.*, 2008.

tRFs correspondent aux extrémités des ARNt et ont une longueur comprise entre 14 et 30 nucléotides (Shen *et al.*, 2018).

Cette classe d'ARNnc montre divers rôles dans des conditions physiologiques ou dans l'apparition de maladies (revue Shen *et al.*, 2018). Des études en culture cellulaire ont permis d'avancer dans les connaissances sur les fonctions des tRFs. Lee *et al.*, (2009) ont mis en évidence le rôle de tRF-1001 dans la prolifération cellulaire. Une diminution de l'expression de tRF-1001, par utilisation de siARN, empêche la prolifération des cellules qui sont bloquées au stade G2. Ce blocage est réversible par ajout de tRF-1001 résistants aux siARN (Lee *et al.*, 2009). Une autre étude a montré le rôle des tRFs dans la répression post-transcriptionnelle menant à l'arrêt de la progression de métastase dans le cancer du sein (Goodarzi *et al.*, 2015). Une autre étude met en évidence le rôle de tRFs dans l'apparition de certains cancers chez l'homme (Pekarsky *et al.*, 2016).

B. Les ARNs non codant longs

Longtemps considérés comme des déchets du génome, les lncARNs sont aujourd'hui reconnus comme ayant un rôle critique de régulation dans une multitude de processus biologiques. Les lncARNs sont des ARNs non codants d'une longueur supérieure à 200 nucléotides. Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II et peuvent être épissés, avoir une coiffe en 5' et une queue polyadénylée (polyA) en 3' (Mallory and Shkumatava, 2015). Généralement plus courts que les ARNm (ils comprennent en moyenne 1 à 3 exons), les lncARNs ont également une expression spatiale et temporelle spécifique par rapport aux ARNm mais s'exprimeraient, en général, en quantité moindre (Cabili *et al.*, 2011; Derrien *et al.*, 2012; Necsulea *et al.*, 2014). De façon comparable aux gènes codants pour les protéines, les lncARNs possèdent des marques de méthylation d'histones au niveau des promoteurs et de la séquence transcrite, pouvant renseigner sur leur état d'expression (Guttman *et al.*, 2009). Par contre, à l'inverse des gènes codants pour les protéines, les lncARNs ne possèdent donc pas de cadre ouvert de lecture (ORFs pour *open reading frames*) et ils sont peu conservés entre les espèces. Certains lncARNs conservent leur synténie mais il est rare que les lncARNs présentent d'importantes conservations de séquences entre les espèces (Necsulea *et al.*, 2014; Ulitsky *et al.*, 2011). Cette faible conservation des lncARNs a participé à la croyance première que les lncARNs n'avaient pas de rôle biologique. L'absence de conservation s'explique par l'évolution rapide de ces séquences. Les exons des lncARNs sont moins bien conservés que les exons des gènes codants pour des protéines (Ulitsky *et al.*, 2011) mais ils restent mieux conservés que leurs séquences introniques et les séquences intergéniques (Kapusta *et al.*, 2013; Kelley and Rinn, 2012).

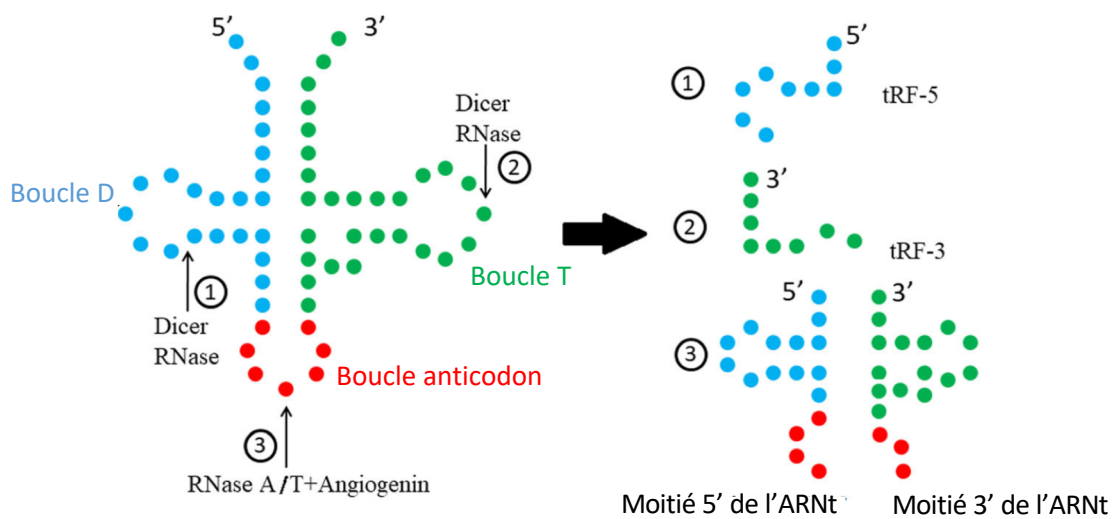


Figure 33 : Biogenèse et classification des fragments dérivés des ARNt.

Les fragments dérivés des ARNt sont produits par Dicer et des RNases qui clivent les ARNt matures pour former les tRF-5 (1) et tRF-3 (2). Le fragment restant est clivé pour former deux moitiés (5' et 3') de l'ARNt.

Issue de Shen *et al.*, 2018.

Les lncARNs sont donc présents en grand nombre dans le génome. Étant donnée leur faible conservation entre les espèces et leur faible expression, le nombre de lncARN fonctionnel est difficile à déterminer.

1. Classification des lncARNs

Des classifications des lncARNs ont vu le jour dans le but de faciliter la compréhension de leur mode d'action et de leur fonction. Deux classifications principales sont abordées par la suite : la classification dépendante de l'association des lncARNs avec les gènes codants pour des protéines et la classification des lncARNs en fonction des mécanismes d'actions.

a. Classification des lncARNs en fonction de leur localisation par rapport aux gènes codant pour les protéines.

Les lncARNs peuvent être classés en fonction de leur localisation dans le génome par rapport aux gènes codant pour des protéines (Ma *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013a) :

- Les lncARNs intergéniques (lincRNA pour *long intergenic non coding RNA*) ont leurs gènes localisés dans les régions intergéniques et ne chevauchent aucun gène codant pour des protéines (**Figure 34A**).
- Les lncARNs bidirectionnels sont situés à moins de 1000pb d'un gène codant pour les protéines sans les chevaucher. Le lncARN et le gène codant pour une protéine sont proches, leur permettant de partager leur promoteur. Ils ont une orientation « tête-bêche » des transcrits, ce qui entraîne une transcription en sens opposé des deux gènes (**Figure 34B**). Cette organisation transcriptionnelle s'applique à environ 10% des gènes codants pour les protéines connus chez la souris et l'homme (Sun *et al.*, 2013a).
- Les autres lncARNs ont leurs gènes qui chevauchent au moins un gène codant pour les protéines. Parmi eux on distingue les lncARNs introniques et exoniques. Comme leurs noms l'indiquent, les lncARNs introniques sont transcrits entièrement à partir d'une région intronique d'un gène (**Figure 34C**). Les lncARNs exoniques ont leur transcription qui chevauche au moins un exon d'un gène codant pour les protéines (**Figure 34D**). Pour ces lncARNs chevauchants, le sens de transcription est également précisé : un lncARN sens est transcrit dans le même sens que le gène qu'il chevauche et un lncARN antisens est transcrit dans le sens inverse du gène qu'il chevauche (**Figure 34C-D**).

Dans le cas des lncARNs bidirectionnels, on peut retrouver des mécanismes d'action prépondérants. Par exemple, ils peuvent réguler l'activation ou la répression de la transcription des gènes. Le gène *Pcna* (pour *proliferating cell nuclear antigen*) présente un promoteur commun avec le lncARN bidirectionnel *AK007836* (Lee *et al.*, 2012). La protéine PCNA joue un rôle dans la réplication et la

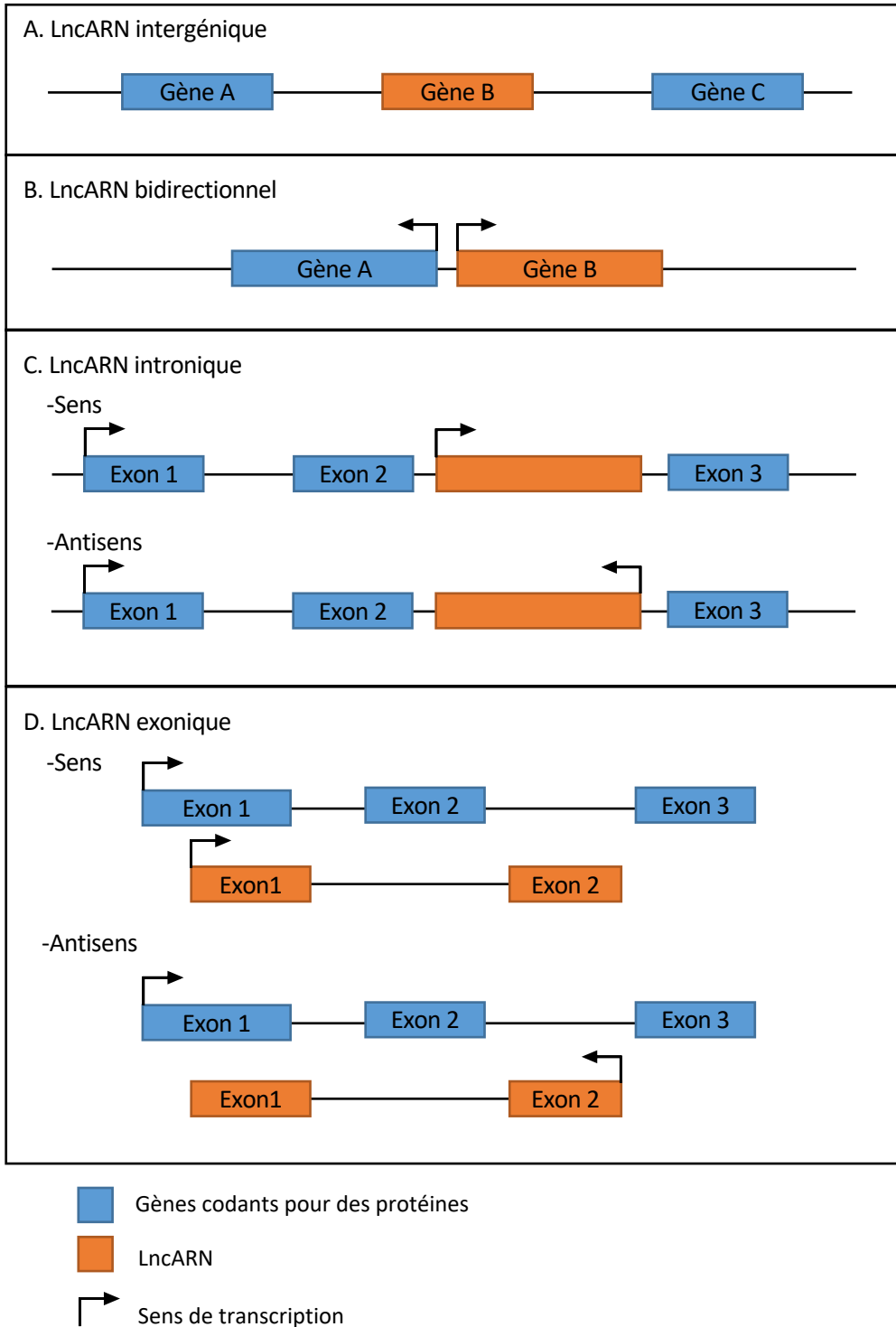


Figure 34 : Classification des LncARNs en fonction de leurs localisations par rapport aux gènes codants pour des protéines.

réparation de l'ADN mais également dans la progression du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire. Des études *in vitro* en cultures cellulaires et *in vivo* dans différents tissus chez la souris ont montré une corrélation positive entre l'expression de *Pcna* et *AK007836*. La diminution de l'expression de *AK007836* suite à l'injection de siARN entraîne une diminution de l'expression de *Pcna* dans les cellules normales. A l'inverse, l'expression de *Pcna* n'est pas modifiée dans les cellules cancéreuses suite à l'inhibition de *AK007836* (Lee *et al.*, 2012). Ces résultats montrent une association de l'expression des deux gènes en raison de leur promoteur commun : la transcription du lncARN bidirectionnel *AK007836* active la transcription de *Pcna*. Cette association peut néanmoins être perturbée dans des cas pathologiques comme le cancer. De façon générale, les lncARNs proches ou superposés aux gènes codant des protéines semble agir par des processus liés à la transcription (Sun *et al.*, 2013a).

b. Classification des lncARNs en fonction de leurs mécanismes d'actions.

Une deuxième classification basée sur les mécanismes d'actions des lncARNs a été démontrée. Cette classification est divisée en 3 groupes (Ma *et al.*, 2013; Perry and Ulitsky, 2016) :

- Les lncARNs où seulement la transcription est importante : dans ce groupe, le lncARN transcrit n'a pas de fonction. C'est l'action de transcription qui entraîne des interférences et affecte les éléments régulateurs présents sur le gène du lncARN. *Airn* (pour *antisens Igf2r RNA* aussi nommé *Air*) est un lncARN antisens. Son gène est superposé au gène *Igf2r* (pour *insulin-like growth factor 2 receptor*). Latos *et al.* (2012) ont étudié la répression de *Airn* sur l'expression de *Igf2r* au niveau de l'allèle paternel. Différentes délétions du gène *Airn* ont été réalisées pour étudier l'effet de ces tronçures sur la régulation post-transcriptionnelle de *Airn* sur *Igf2*. *In vivo*, aucune de ces tronçures n'a affecté la répression de *Igf2* par *Airn*. La seule partie du gène *Airn* qui n'a pas pu être tronquée contient le promoteur du gène *Igf2r* (Latos *et al.*, 2012). Ainsi ces résultats suggèrent que la répression de l'expression de *Igfr2* par *Airn* n'est pas la conséquence d'une régulation post-transcriptionnelle, mais résulte uniquement de la transcription de *Airn* qui inhibe le promoteur du gène *Igfr2*.
- Certains lncARNs agissant en cis : le lncARN agit à proximité ou sur son site de transcription en recrutant des facteurs répressifs (comme *H19* (Monnier *et al.*, 2013)) ou activateurs (comme *Hottip* (Yang *et al.*, 2014)). Le recrutement de ces facteurs entraîne des modifications multiples. *Airn* présente un mécanisme d'action en cis et régule l'expression de gènes voisins nommés *Slc22a3* et *Slc22a2* dans le placenta de souris (Sleutels *et al.*, 2002). Avant 15,5 *jpc*, l'expression de *Slc22a3* a lieu majoritairement à partir de l'allèle maternel dans le placenta. A partir de 15,5 *jpc* l'expression de *Slc22a3* est biallélique. Nagano *et al.* (2008) ont montré que la répression

de l'expression de *Slc22a3* sur l'allèle paternel avant 15,5 *jpc* coïncide avec l'accumulation du lncARN *Airn* au niveau du promoteur de *Slc22a3*. A partir de 15,5 *jpc*, une diminution significative de la « couverture aérienne » du promoteur de *Slc22a3* par le lncARN *Airn* a été observé, sans diminution de l'expression de ce lncARN (Nagano *et al.*, 2008). Ces résultats montrent un lien entre la localisation de *Airn* au niveau du promoteur de *Slc22a3* de l'allèle paternel et la répression de la transcription de *Slc22a3*. *Airn* s'accumule au niveau du promoteur paternel de *Slc22a3*, recrute l'histone méthyltransférase G9a et entraîne la méthylation de H3K9 résultant au silençage allélique (Nagano *et al.*, 2008). Ainsi dans ce cas, *Airn* agit en *cis* en recrutant un facteur de répression.

D'autres lncARNs avec un mécanisme d'action en *cis* agissent comme des leurres. Dans le cas de tumeur humaine, il a été mis en évidence *in vitro* que le lncARN anti-sens *PACER* (pour *P50-Associated COX-2 Extragenic RNA*) sert de leurre en séquestrant la sous-unité de p50 nommée NF-κB. Le lncARN empêche la sous unité NF-κB de se fixer au promoteur de *COX-2* (pour *Cytochrome c Oxidase Subunit II*) et facilite ainsi l'activation de la transcription de *COX-2* (Krawczyk and Emerson, 2014). La fonction de leurre de *PACER* permet l'augmentation de l'expression de *COX-2* dans les cellules cancéreuses.

- Certains lncARNs agissant en *trans* : ces lncARNs agissent indépendamment de leur site de transcription. Ces lncARNs régulent la transcription au niveau de locus éloignés de leur site de transcription. Ces régulations peuvent avoir lieu dans le noyau et/ou dans le cytoplasme d'où une présence des lncARNs à la fois dans le noyau et/ou le cytoplasme des cellules. Par exemple, le lncARN HOTAIR agit en *trans* en jouant le rôle d'échafaudage pour des complexes de modifications d'histones. Tsai *et al.* (2010) ont mis en évidence que le lncARN HOTAIR peut lier PCR2 à son extrémité 5' et LSD1 à son extrémité 3'. Ainsi ce lncARN forme une plateforme de liaison des complexes de modification de la chromatine : cela permet de coordonner l'action des deux complexes sur la chromatine (Tsai *et al.*, 2010).

Il est également possible de retrouver des classifications légèrement différentes en fonction d'autres paramètres des lncARNs (Ulitsky and Bartel, 2013). En effet, il reste encore beaucoup de questions sur le fonctionnement des lncARNs et leurs mécanismes d'actions. Il est intéressant de voir que la classification des lncARNs en fonction de leur localisation par rapport aux gènes codants pour des protéines ne détermine pas leurs mécanismes d'actions. Le tableau de Ma *et al.* (2013) (**Table 1**) montre bien la complexité pour établir une classification des lncARNs. Par contre, la localisation des lncARNs dans la cellule permet d'émettre des hypothèses sur le type de mécanisme d'action utilisé par

Mécanismes fonctionnels	Gènes
Régulation de la transcription	
Cis	Air ^d , Alpha 250/Alpha 280 ^d , ANRIL ^d , Beta-globin transcripts ^b , Beta-MHC antisense transcripts ^d , CAR Intergenic 10 ^d , CCND1 associated ncRNAs ^b , COLDAIR ^b , COOLAIR ^d , DHFR upstream transcripts ^d , Emx2os ^d , Evf2 ^d , fbp1+ promoter RNAs ^b , GAL10-ncRNA ^d , H19 ^b , H19 antisense ^c , H19 upstream conserved 1 and 2 ^b , H19 ICR ncRNAs, HOTAIRM1 ^b , HOTTIP ^d , Hoxa11as ^d , ICR1 ^c , Kcnq1ot1 ^d , Khps1a ^d , L1PA16 ^b , LINOcR ^b , MEG3 ^b , Mistral ^b , Msx1as ^d , Nespas ^d , ncR-Upar ^b , PHO5 lncRNA ^d , PHO84 antisense ^d , pRNA ^b , PWR1 ^d , RTL ^d , SRG1 ^{b,c} , TEA ncRNAs ^c , TIR1axut ^d , TPO1axut ^d , Tsix ^b , Xist ^d
Trans	7SK ^b , B2 SINE RNA ^b , GASS ^b , HOTAIR ^d , Jpx ^b , LXRBSV ^f , PR antisense transcripts ^d , VL30 RNAs
Indéterminé	Adapt33 ^b , antiPeg11 ^d , Gtl2-as ^d , HOXA3as ^d , HOXA6as ^d , linc1242 ^b , linc1257 ^b , linc1368 ^b , linc1547 ^b , linc1582 ^b , linc1609 ^b , linc1610 ^b , lincRNA-p21 ^b , lincRNA-RoR ^b , Malat1-as ^b , MEG9 ^b , NDM29 ^a , NEAT1 ^b , PANDA ^b , PCAT-1 ^b , Rian ^b , SatIII transcripts ^b , SNHG3 ^c , SRA ^c , Tmevpg1 ^b , TncRNA ^b , TUG1 ^b
Régulation de la traduction	
	BC1 ^b , BC200 ^b , Gadd7, SNHG1 ^b , SNHG6 ^d , snaR ^b , Zeb2NAT ^d
Régulation de l'épissage	
	MIAT ^b , LUST ^d , Malat1 ^b , SAF ^d , VL30 RNAs, Zeb2NAT ^d
Autres régulations post-transcriptionnelles	
	21A ^b , 1/2-sbsRNA1 ^c , At4 ^b , BACE1AS ^d , CDR1 AS ^d , Dio3os ^b , E2F4 antisense ^d , Emx2os ^d , Gadd7, H19 ^b , HULC ^b , HSUR1 and HSUR2, IPS1 ^b , KRASP1 ^b , Linc-MD1 ^b , psvA antisense RNA ^d , PTENP1 ^b , tie-1as ^d , WTI-AS ^d
Autres mécanismes fonctionnels	
	7SL ^b , Beta 2.7 RNA, Centromeric α -satellite RNA ^b , ENOD40 ^c , EBER1 and EBER2 RNAs, G22 ^b , L1PA16 ^b , hsr omega transcripts ^b , meiRNA, Maternal RNA templates ^{c,d} , Maternal somatic nucleus RNAs ^{c,d} , MER11C ^b , NRON ^d , ncs-1 ^b , roX1 and roX2 ^b , sFRNA, TERRA, TERC ^b , VAI and VAIL RNAs, VegT RNA ^c , Xisirts, Y RNAs ^b

Table 1 : Les mécanismes fonctionnels et la localisation génomique des lncARNs.

^blncARN , ^clncARN sens, ^dlncARN antisens, ^elncARN introniques

Ma et al., 2013.

ces lncARNs. Enfin, certains lncARNs présentent un épissage particulier et créent une classe de lncARNs appelés les ARNs circulaires (ARNcirc) qui n'est pas indiquée dans les classifications précédentes.

c. Les ARNs circulaires

D'abord découvert dans les organismes pathogènes, les ARNcirc ont été découverts plus largement chez les mammifères dans les années 1990. Les ARNcirc forment des boucles en joignant leurs extrémités 3' et 5' de façon covalente. Une fois circularisés, ils ne possèdent plus de polarité 5'-3' ni de queue polyA. Les ARNcirc sont très abondants et présentent une expression tissu spécifique (Memczak *et al.*, 2013; Salzman *et al.*, 2013). Leur structure circulaire rend ces lncARNs plus stables que les ARNs linéaires. Par exemple, ils ne peuvent pas être dégradés par les exonucléases puisqu'ils n'ont pas d'extrémités libres (Jeck *et al.*, 2013; Suzuki and Tsukahara, 2014).

La biogenèse des ARNcirc s'effectue par « backsplicing » appelé également « tête à queue » ou épissage inverse. Le « backsplicing » comprend un épissage dans l'ordre inverse des exons et/ou des introns des ARNs menant à un produit circulaire. La circularisation consiste en l'attachement de façon covalente d'un site d'épissage donneur (5') et d'un site d'épissage accepteur (3') en amont du site donneur (**Figure 35**). Les ARNcirc peuvent donc être issus de la circularisation d'introns (ARNcirc intronique) ou d'exons (ARNcirc exonique) ou les deux (ARNcirc exon-intron) (Beermann *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015).

Les ARNcirc semblent agir majoritairement comme des éponges à miARN. Par exemple, l'ARN *CircSry* découvert dans le testicule de souris est transcrit en antisens à partir du gène *Sry* (Capel *et al.*, 1993). L'ARN *circSry* joue le rôle d'éponge pour le miR-138 (Hansen *et al.*, 2013). Les ARNcirc agissent également dans la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel en liant des ARNs mais aussi les protéines (Abdelmohsen *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2015). Ils peuvent également intervenir comme molécule d'échafaudage (Zeng *et al.*, 2017). Les ARNcirc sont également retrouvés dans des conditions pathologiques : dans le cas de cancers (revue Zhang *et al.*, 2018), de maladies neurologiques (Lukiw, 2013) ou de maladies cardiovasculaires (Altesha *et al.*, 2019).

2. Les fonctions majeures régulées par les lncARNs

a. Les lncARNs dans l'inactivation de l'X

Chez les mammifères euthériens, les mâles (XY) et les femelles (XX) ont le même niveau d'expression des gènes du chromosome X dans les cellules malgré la présence de deux chromosomes X chez la femelle. Chez les femelles, tôt durant le développement embryonnaire, un des deux chromosomes X n'est plus transcrit suite à un phénomène appelé l'inactivation du chromosome X (XCI pour *X chromosome inactivation*). Le XCI permet la compensation du dosage du chromosome X chez

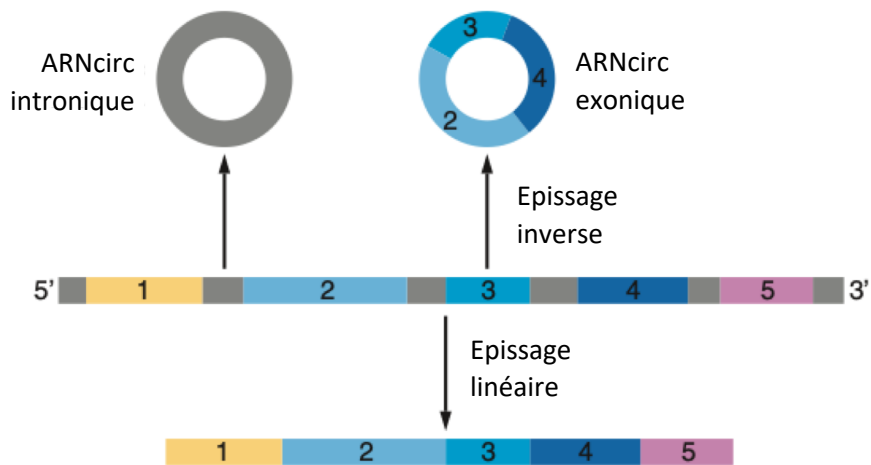


Figure 35 : Biogenèse des ARNs circulaires (ARncirc).

Représentation schématique de l'épissage inverse et linéaire. L'épissage inverse permet de former des ARncirc introniques, exoniques ou les deux. L'épissage linéaire permet la maturation des ARNs : ARNm ou lncARNs.

Issue de Beermann *et al.*, 2016.

la femelle en inactivant transcriptionnellement un des deux chromosomes X : le chromosome X inactivé est donc sous forme d'hétérochromatine.

Chez les souris, deux types de XCI ont été décrits : le XCI soumis à empreinte (durant le stade 4 à 8 cellules dans l'embryon préimplantatoire et dans les tissus extra-embryonnaire (Borensztein *et al.*, 2017; Okamoto *et al.*, 2004) et le XCI aléatoire (dans les cellules embryonnaires après le stade 8 cellules (Okamoto *et al.*, 2004). Le XCI aléatoire est ensuite maintenu dans les cellules somatiques tout le long de la vie de l'individu. Les souris adultes sont donc mosaïques pour l'expression des gènes du chromosome X (Lyon, 1962). Néanmoins, certains gènes échappent à l'XCI et restent exprimés par les deux chromosomes X chez la femelle constituant des exceptions à la règle (Balaton and Brown, 2016).

L'existence des deux types d'empreinte chez une espèce comme chez la souris n'est pas commun. Chez d'autre espèce euthérienne, comme l'homme et le lapin, seul le XCI aléatoire est observé (Okamoto *et al.*, 2011).

Dans les années 90, le lncARN *Xist* (pour *X inactive specific transcript*) est identifié au niveau de la région *Xic* et semble être l'acteur principal nécessaire pour le XCI (Borsani *et al.*, 1991; Brockdorff *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1991). *Xist* est également nécessaire pour la survie des embryons femelles (Marahrens *et al.*, 1997). La délétion ciblée d'un seul allèle *Xist* dans des lignées de cellules souches embryonnaires ou chez la souris a mis en évidence un défaut de XCI du chromosome X portant l'allèle *Xist* délété : le XCI ne se fait plus de manière aléatoire puisque seul l'X intact est inactivé (Marahrens *et al.*, 1997; Penny *et al.*, 1996). A l'inverse la présence de *Xist* sur un autosome mime l'effet du XCI et affecte l'expression des gènes en *cis* (Herzing *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1996). Ainsi, l'expression monoallélique du lncARN *Xist* régulée à la hausse entraine le silençage du chromosome X à partir duquel il est exprimé.

Le transcrit *Xist* mesure 17 kb, il est polyadénylé, épissé, avec une localisation nucléaire (Gendrel and Heard, 2014). Comme les lncARNs, *Xist* ne présente pas d'ORF et il est peu conservé, à l'exception de certaines séquences répétées en tandem. Ces séquences répétées (nommées de A à F ; **figure 36**) ont été étudiées dans le but de déterminer leurs fonctions dans le mécanisme d'action de *Xist*. La séquence répétée nommée C, localisée sur l'exon 1 de *Xist*, a été étudiée dans des cellules en culture. Cette séquence a été liée de façon complémentaire soit à des PNA (pour *Peptide Nucleic Acid*) (Beletskii *et al.*, 2001) ou à des LNA (pour *locked nucleic acid*) (Sarma *et al.*, 2010) créant un complexe RNA-PNA ou RNA-LNA. Ces complexes empêchent la fixation de *Xist* au chromosome X à partir duquel il est exprimé : aucun XCI n'est initié dans ces cellules (Beletskii *et al.*, 2001; Sarma *et al.*, 2010). Ainsi, la séquence répétée C est essentielle pour l'association et la diffusion de *Xist* sur le chromosome X.

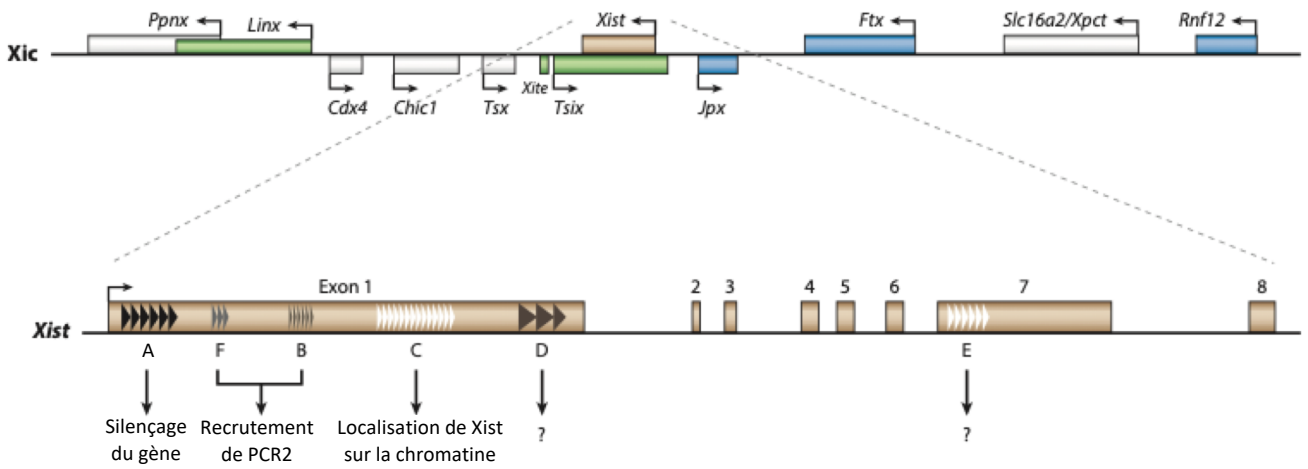


Figure 36 : Le centre inactivateur de l’X (Xic) et le gène Xist.

Le centre inactivateur de l’X (Xic) comprend plusieurs lncARNs (appelés *Xist*, *Tsix*, *Jpx* et *Ftx*) et des gènes codants pour des protéines qui peuvent être impliquées dans l’inactivation du chromosome X (XCI). Les gènes régulant positivement le XCI sont en bleu et ceux qui régulent négativement le XCI sont en vert. Issue de Gendrel et Heard, 2014.

L'enrobage du chromosome X par *Xist* est indispensable pour l'établissement du XCI (Beletskii *et al.*, 2001). La séquence répétée A localisée en 5' de *Xist* est la plus conservée. Une délétion de cette séquence a été réalisée en culture cellulaire pour pouvoir déterminer sa fonction. Cette délétion n'affecte pas l'expression de *Xist*, ni son association et sa diffusion au niveau du chromosome X à partir duquel il est exprimé, mais le XCI ne se met pas en place (Wutz *et al.*, 2002). La séquence répétée A (en 5' de *Xist*) intervient donc dans l'établissement du XCI.

L'inactivation de l'X, induit suite à son revêtement par *Xist*, a lieu grâce aux changements structuraux de la chromatine qui devient alors de l'hétérochromatine. Il se met rapidement en place un compartiment en périphérie nucléaire comprenant le chromosome X inactif dénué de machinerie de transcription appelé le corpuscule de Barr ou « Barr body » (da Rocha and Heard, 2017). Des marques répressives telles que la triméthylation H3K27 (H3K27me3) déposées par PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) sont alors retrouvées au niveau du chromosome X (Calabrese *et al.*, 2012; Marks *et al.*, 2009). Plusieurs techniques ont mis en évidence des interactions de *Xist* avec différentes protéines impliquées dans le XCI (Chu *et al.*, 2015; Minajigi *et al.*, 2015). Ainsi le lncARN *Xist* agit en recrutant des protéines au niveau du chromosome X nécessaires pour son inactivation transcriptionnelle. *Xist* possède plusieurs mécanismes d'actions indispensables pour la mise en place du XCI. Ce lncARN est un exemple incontestable du rôle prépondérant que peuvent jouer les lncARN dans des fonctions importantes du développement. Également présent sur le locus *Xic*, d'autres lncARNs sont exprimés et régulent l'expression de *Xist* et assure le silençage d'un seul chromosome X chez la femelle.

Tsix (pour Transcript, XIST antisens RNA) est un lncARN transcrit en antisens de *Xist* qui ne possède pas d'ORF (**Figure 36**) (Lee *et al.*, 1999). L'expression de *Tsix* est détectée dans les blastocystes à partir du X_m lorsque l'inactivation du X_p se produit dans le trophoctoderme : son expression est soumise à empreinte (Sado *et al.*, 2001). Son blocage n'a pas d'effet sur le développement embryonnaire lorsque le X affecté est hérité du père. A l'inverse, si la mutation est héritée de la mère, cela entraîne une létalité embryonnaire suite à l'expression ectopique de *Xist* qui inactive les deux chromosomes X chez la femelle ou le chromosome X unique chez l'homme dans les tissus extra-embryonnaire (Sado *et al.*, 2001). Ainsi *Tsix* joue un rôle essentiel au niveau des chromosomes X_m des tissus extra-embryonnaires chez la souris : il empêche l'inhibition ectopique des chromosomes X. Le phénotype de létalité embryonnaire peut être sauvé en délétant le gène *Xist* paternel chez les souris mutées pour le *Tsix* maternel (Sado *et al.*, 2001). *Tsix* joue un rôle crucial en *cis* pour réprimer l'expression de *Xist* sur le chromosome actif maternel. Ce lncARN protège le X_m du silençage ectopique par *Xist* dans les tissus extra-embryonnaires (Gayen *et al.*, 2015).

Les lncARNs *Jpx* (pour *Jpx transcript*, *Xist activator* aussi nommé Enox) et *Ftx* (pour *Ftx transcript*, *Xist regulator*) sont également retrouvés au niveau du Xic (**Figure 36**). Ces lncARNs sont présents chez les mammifères euthériens. Ils présentent une bonne conservation au cours de l'évolution et n'ont pas d'ORF (Chureau *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2010). L'étude de *Jpx* et *Ftx* dans les cellules ES de souris a mis en évidence une augmentation de l'expression de ces gènes au début du XCI, lors de la différenciation des cellules ES femelles (Chureau *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2010). L'expression de *Jpx* au début du XCI est possible car il échappe à l'inactivation de l'X (Johnston *et al.*, 2002). L'inactivation hétérozygote de *Jpx* ($\Delta Jpx/+$) dans des cultures cellulaires ES hybrides entraîne une diminution de l'expression de *Jpx*, diminue l'expression de *Xist* entraînant une létalité cellulaire lors de la différenciation des cellules XX (Tian *et al.*, 2010). L'expression de *Jpx* à partir d'un transgène autosomal permet de récupérer l'expression de *Xist* et de diminuer fortement la létalité des cellules XX $\Delta Jpx/+$ (Tian *et al.*, 2010). *Jpx* est donc un régulateur positif de *Xist* sur le X inactivé en agissant en *trans*. L'étude de Sun *et al.* (2013) montre que *Jpx* agit sur l'expression de *Xist* en liant la protéine CTCF (pour *CCCTC-binding factor*) : il l'éloigne du promoteur *Xist* lors du XCI. La protéine CTCF agit en amont du XCI pour inhiber l'expression de *Xist* (Sun *et al.*, 2013b). Ainsi, *Jpx* agit comme un leurre en empêchant l'action inhibitrice de CTCF sur l'expression de *Xist*.

La régulation de l'inactivation de l'X est un processus complexe faisant intervenir des protéines, des modifications épigénétiques régulés par des lncARNs. Les lncARNs présentent des rôles spécifiques avec des mécanismes d'action variés.

b. L'empreinte génomique parentale et les lncARNs

Chez les organismes diploïdes, l'empreinte génomique parentale est l'expression différentielle de certains gènes en fonction de leurs origines parentales (paternelle ou maternelle). Ce phénomène consiste à inactiver un des deux allèles d'un chromosome parental alors que le second reste actif.

L'expression des gènes soumis à empreinte est régulée en *cis* par de courtes séquences caractéristiques des clusters d'empreintes génomiques appelées ICE (pour *imprint control element* ou IGN pour *imprint gene network*). L'ICE subit des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN) sur un seul chromosome parental : c'est « l'empreinte génomique ». Ces modifications ont lieu durant la gamétogenèse mâle ou femelle et perdurent dans l'embryon diploïde. Le chromosome parental n'ayant pas un ICE méthylé sera à l'origine de l'expression des gènes soumis à empreinte. La délétion de l'ICE empêche les gènes soumis à empreinte d'être exprimés selon un schéma parental spécifique (Koerner *et al.*, 2009). Les 3 lncARNs *Airn*, *H19* et *Kcnq1ot1* (pour *KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1*) sont localisés aux niveaux de clusters soumis à une empreinte. *Airn* et *Kcnq1ot1* sont sur

un cluster de gène présentant une empreinte d'origine maternelle alors que H19 est sur un cluster avec une empreinte d'origine paternelle.

Déjà décrits précédemment, *Airn* est un lncARN qui réprime la transcription en *cis* des gènes *Igf2r*, *Slc22a2* et *Slc22a3* sur l'allèle paternel. Sur le chromosome 17, la transcription du gène *Airn* est initiée seulement à partir de l'allèle paternel en antisens de *Igf2r* : le transcrit *Airn* chevauche le promoteur du gène *Igf2r*. Le promoteur du gène *Airn* est localisé sur l'intron 2 du gène *Igfr2* dans une région de 3,7 kb définie comme l'ICE (Wutz *et al.*, 1997). Le transcrit *Airn* non épissé est instable et se localise dans le noyau des cellules (Seidl *et al.*, 2006). Pour déterminer, si le transcrit *Airn* est responsable de la répression des gènes sur l'allèle paternel, une troncature de ce lncARN a été réalisée chez la souris (Sleutels *et al.*, 2002). Une cassette de polyadénylation a été insérée dans le gène *Airn* permettant de tronquer 96% du transcrit (alors nommé *Airn-T*) sans perturber l'ICE. Les souris mutées au niveau de l'allèle maternel ont un phénotype normal. Par contre les souris ayant la mutation sur l'allèle paternel présentent une perte de l'empreinte des gènes *Igf2r*, *Slc22a2* et *Slc22a3* et une diminution de leur poids à la naissance (Sleutels *et al.*, 2002): ce phénotype est comparable à celui des souris présentant une délétion de l'ICE (Wutz *et al.*, 2001). Ces résultats mettent en évidence que le transcrit *Airn* est nécessaire en *cis* pour la répression des gènes *Igf2r*, *Slc22a2* et *Slc22a3* sur l'allèle paternel.

Localisé sur le chromosome 7 chez la souris, le cluster de gènes conservé de 600 kb comprenant les gènes *H19*, *Igf2*, *Slc38a3* (pour *solute carrier family 38 member 4*) et *Peg1* (pour *paternally expressed gene 1*) est soumis à empreinte. Conservé chez les mammifères, le lncARN *H19* mesure 2,3 kb, il est épissé, possède une coiffe en 5' et une queue poly-A (Brannan *et al.*, 1990). *H19* est fortement exprimé à partir de l'allèle maternel dès 8,5 *jpc* dans les tissus embryonnaires dérivés de l'endoderme et du mésoderme (Poirier *et al.*, 1991). Il a été mis en évidence que le lncARN *H19* agit en *trans* en recrutant MBD1 (*methyl CpG binding domain protein 1*) sur les sites DMR (differentially methylated region 1 ou ICR pour imprinted control region) des gènes *Igf2*, *Slc38a4* et *Peg1* soumis à empreinte (Gabory *et al.*, 2009; Monnier *et al.*, 2013). MBD1 permet le dépôt et le maintien des marques d'histones H3K9me3 qui répriment la transcription de *Igf2* sur l'allèle paternel et de *Slc38a4* et *Peg1* sur les deux allèles permettant ainsi une régulation fine de l'expression de ces gènes de croissance (**Figure 37**).

Il reste d'autres gènes régulés par H19 qui ne sont pas affectés en absence de MBD1 (*Gtl2*, *Cdkn1c*, *Igf2r*, et *Gnas*) suggérant que H19 pourrait réguler leur expression via d'autres mécanismes ou partenaires.

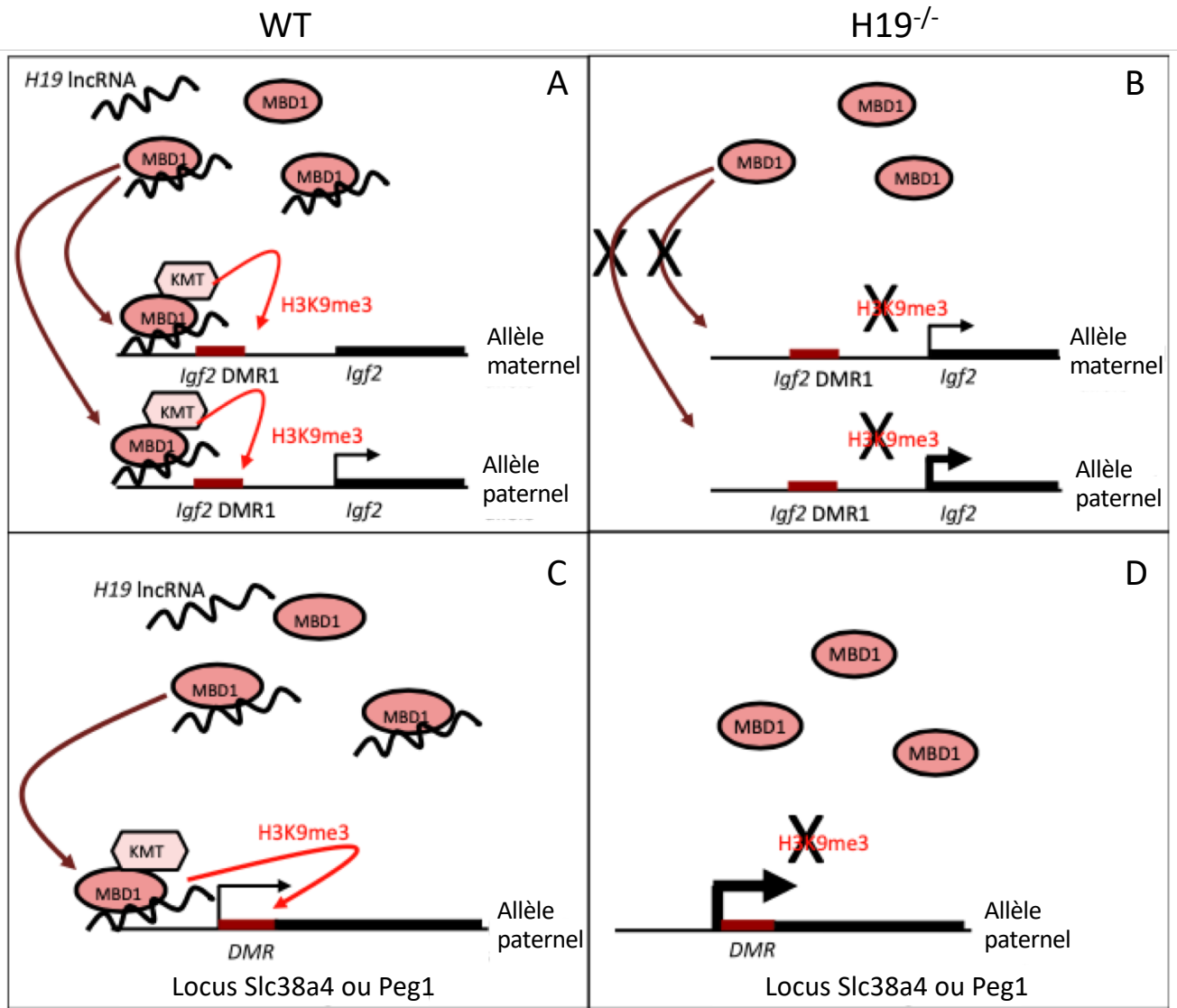


Figure 37 : Régulation de l'expression de *Igf2*, *Slc38a4* et *Peg1* par H19.

Chez les souris WT (A et C), le lncARN H19 interagit avec MBD1 et permet sa localisation au niveau des régions DMR1 sur les allèles paternels et maternels (A), et au niveau de la région DMR sur l'allèle paternel. Avec l'histone lysine-méthyltransférase (KMT) H3K9, H19 induit des méthylations H3K29me3 au niveau de ces régions.

Dans les cellules mutantes *H19*^{-/-} (B et D), MBD1 n'est pas recruté au niveau des régions DMRT1 et DMR entrainant la perte des marques de méthylation H3K9me3. La perte de ces marques entraine une surexpression de *Igf2* (au niveau de l'allèle maternel et paternel) et de *Slc38a4* ou *Peg1* (au niveau de l'allèle paternel).

Issue de Monnier *et al.*, 2013.

Également présent sur le chromosome 7, le locus à empreinte génomique *Kcnq1* (aussi appelé *Kvdmr1*, *Lit1*) s'étend sur 1Mb (**Figure 38**). Le lncARN *Kcnq1ot1* présent sur ce locus est impliqué dans la régulation de l'empreinte génomique. Ce locus comprend le lncARN *Kcnq1ot1* exprimé à partir de l'allèle paternel et une dizaine d'autres gènes codants pour des protéines exprimées à partir de l'allèle maternel (Kanduri, 2011).

Kcnq1ot1 est un ARN nucléaire stable de 91kb transcrit en antisens à partir d'une région très conservée présente dans l'intron 10 du gène *Kcnq1* (pour potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1) (Pandey *et al.*, 2008). Chez la souris, la délétion ou l'insertion d'un signal d'arrêt de la transcription en aval du promoteur du gène *Kcnq1ot1* entraîne une perte de l'empreinte au niveau du locus et donc de l'expression des gènes voisins (Fitzpatrick *et al.*, 2002; Mancini-DiNardo, 2006). Ainsi, ces résultats montrent que le lncARN *Kcnq1ot1* est nécessaire pour le maintien de l'empreinte génomique au niveau du locus. Ce n'est pas l'action de transcription mais le lncARN *Kcnq1ot1* lui-même qui agit en *cis* pour réprimer l'expression gènes voisins.

Le lncARN *Kcnq1ot1* est exprimé dans tous les tissus chez la souris. Néanmoins, c'est seulement dans le placenta que tous les gènes du locus sont soumis à l'empreinte parentale. Dans les autres tissus, seuls les gènes voisins (les plus proches du lncARN: *Cdkn1c*, *Kcnq1*, *Slc22a18*, and *Phlda2* (aussi appelé *Tssc3*)) sont soumis à l'empreinte parentale (Lewis *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2008). Des expériences de ChRIP (pour *chromatine RNA immunoprecipitation*) ont mis en évidence que le lncARN *Kcnq1ot1* interagit avec la chromatine dans les cellules du placenta de fœtus de souris à 14,5 *jpc*. Des expérimentations de CHIP dans les cellules placentaires montrent un enrichissement de *Kcnq1ot1* au niveau des promoteurs des gènes *Kcnq1*, *Cdkn1c*, *Cd81*, *Ascl2*, et *Osbpl5* alors qu'il n'y a aucun enrichissement de *Kcnq1ot1* au niveau des gènes qui ne sont pas soumis à empreinte (Pandey *et al.*, 2008). Ces résultats mettent en évidence une régulation par le transcrit *Kcnq1ot1* : il se lie sur les promoteurs des gènes soumis à empreinte dans le placenta et le foie embryonnaire murin.

L'enrichissement du lncARN *Kcnq1ot1* au niveau des promoteurs dans le placenta va de pair avec les niveaux de modification des histones dans ces tissus *Kcnq1ot1* recrute des méthyltransférases au niveau des promoteurs de ces gènes voisins pour réprimer de façon spécifique les gènes à empreinte dans le placenta (tissu extra-embryonnaire) (Pandey *et al.*, 2008; Terranova *et al.*, 2008). L'interaction moins importante dans les tissus embryonnaires de *Kcnq1ot1* avec la chromatine pourrait avoir un effet sur le recrutement des méthyltransphérases et entraînerait des différences dans les marques répressives observées dans ces cellules par rapport au placenta. Ainsi le lncARN *Kcnq1ot1* agit différemment en fonction du tissu concerné (embryonnaire ou extra-embryonnaire).

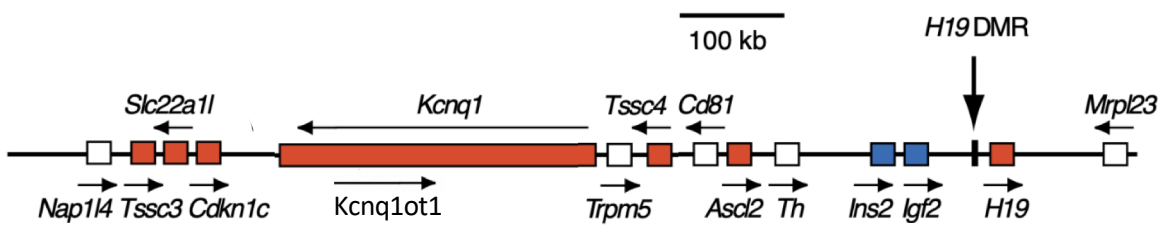


Figure 38 : Locus à empreinte génomique Kcnq1.

Représentation schématique d’une portion du chromosome 7 soumis à empreinte. Les gènes exprimés par l’allèle maternel sont représentés en rouge, ceux exprimés par l’allèle paternel en bleu. Les gènes représentés en blanc ne sont pas soumis à l’empreinte. Les flèches représentent le sens de transcription des gènes.

Issue de Fitzpatrick *et al.*, 2002.

c. *LncARNs impliqués dans le développement embryonnaire*

Chez les vertébrés, 39 facteurs de transcription HOX (pour homeobox aussi appelés gènes homéotiques) sont regroupés sur 4 locus chromosomiques distincts nommés HOXA, HOXB, HOXC et HOXD (**Figure 39**). Ces locus sont essentiels pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur lors du développement embryonnaire (Lemons and McGinnis, 2006; Rinn *et al.*, 2007). Chez les mammifères, l'organisation et la structure des gènes HOX sont hautement conservées. L'expression des gènes HOX dans le temps et dans l'espace est corrélée à leur localisation dans chaque locus : cette propriété est nommée la colinéarité (Lemons and McGinnis, 2006). Par exemple, l'expression différentielle et colinéaire des gènes HOX dans les fibroblastes adultes humains reflète leurs positions le long des axes antéro-postérieurs et proximo-distaux du corps en développement (Rinn *et al.*, 2006). Cette expression spécifique des gènes HOX est essentielle pour spécifier l'identité distale et postérieure des cellules qui est conservée tout au long de la vie de l'individu.

HOTAIR (pour *Hox transcript antisens RNA*) est un lncARN de 2,2kb, très conservé chez les vertébrés, transcrit à partir du locus HOXC chez les mammifères. Comme son nom l'indique, *HOTAIR* est transcrit en antisens par rapport aux gènes canoniques du locus HOXC. Le lncARN *HOTAIR* est indispensable pour réprimer la transcription en *trans* du locus HOXD (Rinn *et al.*, 2007). Cette répression de la transcription est médiée par le dépôt de méthylation H3K27me3 au niveau du locus HOXD par PRC2 et KDM1A (pour lysine déméthylase 1A aussi appelé LSD1 ou BHC110). *HOTAIR* possède deux sites de liaison distincts pour ces complexes (Tsai *et al.*, 2010). Il semblerait qu'un seul transcrit *HOTAIR* puisse lier à la fois PRC2 et KDM1A sur une multitude de gènes pour réprimer leurs expressions (Chu *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2010).

En 2011, un autre lncARN impliqué dans la régulation des gènes HOX a été mis en évidence : il s'agit de *HOTTIP* (pour *HOXA transcript at the distal tip*) (Wang *et al.*, 2011). Transcrit en amont de HOXA13 (extrémité 5' du cluster HOXA), ce lncARN fait 3764 pb, il est épissé et polyadénylé. *HOTTIP* est nécessaire pour activer l'expression en *cis* de ces gènes voisins (Wang *et al.*, 2011). Ce lncARN est nécessaire au maintien des marques activatrices en recrutant la protéine WDR5 sur les gènes HOXA qui dépose les marques H3K4me3 et active la transcription génique (Wang *et al.*, 2011).

Ainsi les lncARNs présentent des rôles primordiaux dans la régulation de l'expression des gènes HOX durant le développement embryonnaire puis tout au long de la vie.

d. *LncARNs avec un rôle architectural*

Certains lncARNs présentent un rôle dans l'établissement de structures nucléaires comme les "paraspeckles", situées dans l'espace inter-chromatinien du noyau cellulaire. Ces structures

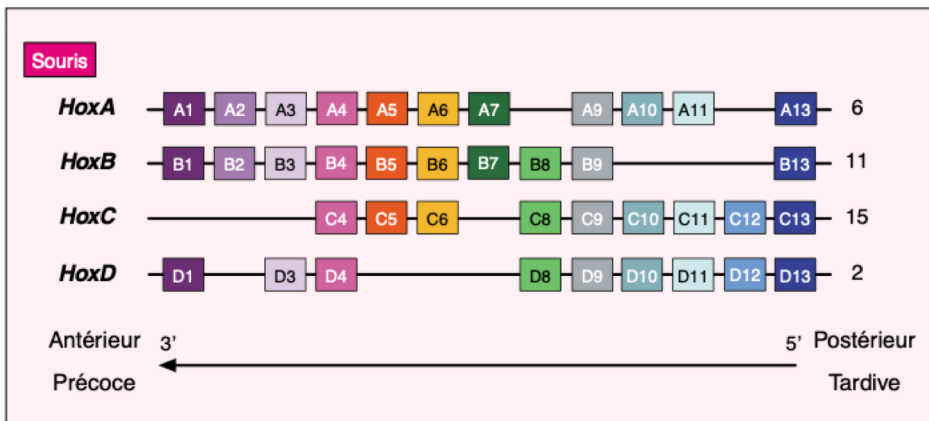


Figure 39 : Complexes *Hox* chez la souris.

Représentation des gènes *Hox* de souris selon leur ordre relatif dans les complexes. La flèche en bas du graphe indique le sens de transcription des gènes *Hox* ainsi que la relation de colinéarité entre l'organisation structurale des complexes et l'expression temporelle et antéro-postérieure des gènes. Issue de Aubin et Jeannotte, 2001.

dynamiques semblent réguler l'expression des gènes, l'activité des protéines, le stockage des ARNs ou encore la réparation des dommages à l'ADN (revue dans (Fox and Lamond, 2010; Taiana *et al.*, 2020).

Par exemple, le lncARN *Neat1* (pour *nuclear paraspeckle assembly transcript 1*) est un composant essentiel du « paraspeckle ». Deux isoformes de *Neat1*, *Neat1_1* de 3kb et *Neat1_2* de 20kb sont générés à partir du même promoteur (Naganuma *et al.*, 2012). Les isoformes *Neat1*, exprimés dans le noyau sont répartis en plusieurs foyers colocalisés avec les « paraspeckles » (Clemson *et al.*, 2009). L'inactivation de *Neat1* par siARN dans différentes lignées cellulaires entraîne une absence de formation des « paraspeckles » (**Figure 40A**). A l'inverse, une surexpression de *Neat1* entraîne un nombre plus élevé de « paraspeckles » dans le noyau de cellules en culture (Clemson *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2009) (**Figure 40B**). Ainsi ces études montrent que le lncARN *Neat1* est nécessaire pour la formation des « paraspeckles » en recrutant et liant les protéines qui composent ces structures (comme PSP1 et P54) (**Figure 40**). Étonnement, l'inactivation du gène *Neat1* chez la souris ne montre pas d'anomalie majeure dans le développement de ces animaux malgré l'absence de « paraspeckles » (Nakagawa *et al.*, 2011). Ce lncARN *Neat1* constitue donc une sorte de plateforme à protéines nécessaire pour la formation de structures nucléaires.

e. Les lncARNs impliqués dans le développement de cancers et autres maladies

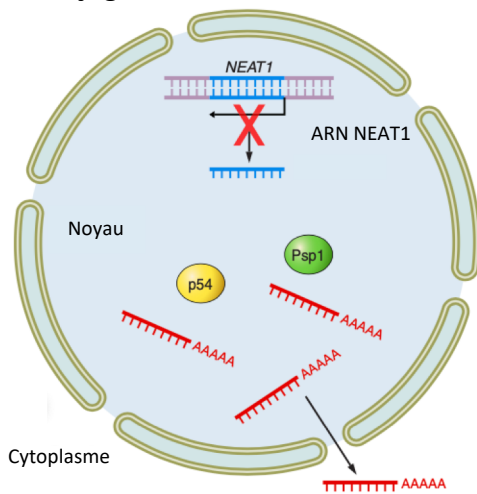
Les analyses transcriptomiques de cellules cancéreuses ont mis en lumière l'implication de lncARNs dans le développement de ces maladies, avec un nombre important de lncARNs dérégulés (étudiés dans les revues : Bhan *et al.*, 2017; Huarte, 2015).

La quasi-totalité des lncARNs décrits précédemment sont également associés à certains cancers (**Figure 41**). Par exemple, HOTAIR est surexprimé dans des cancers du foie (Geng *et al.*, 2011), pancréas (Kim *et al.*, 2013a), du sein (Gupta *et al.*, 2010) et bien d'autres (Bhan *et al.*, 2017). Aussi, les niveaux d'expression de certains lncARNs peuvent être des marqueurs cancéreux mais peuvent également être une cible thérapeutique dans le traitement de cancers. Les lncARNs jouent également un rôle dans l'apparition par exemple de la maladie d'Alzheimer (Luo and Chen, 2016) ou de maladies cardiovasculaire (Uchida and Dimmeler, 2015).

Ainsi comprendre les mécanismes d'actions et les fonctions des lncARNs permettrait de mieux comprendre l'apparition de certaines maladies et de diriger les recherches vers un diagnostic précoce et des thérapies efficaces passant par la régulation des lncARNs.

Les lncARNs décrits précédemment ne représentent qu'une petite partie des lncARNs connus et des fonctions biologiques ou pathologiques auxquels ils sont associés. Ainsi, d'autres lncARNs régulent des processus biologiques comme l'apoptose des cellules (Rossi and Antonangeli, 2014) et le

A. Silençage de Neat1



B. Surexpression Neat1

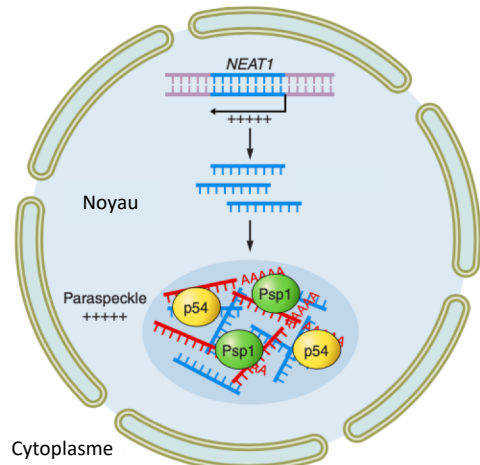


Figure 40 : Rôle structurel de Neat1 dans la formation des « paraspeckles » nucléaires.

L'ARN *Neat1* en bleu est retenu dans le noyau. **(A)** Lorsque *Neat1* n'est pas transcrit, les « paraspeckles » ne se forment pas et les ARNm ne sont pas retenus dans le noyau. **(B)** Une surexpression de *Neat1* augmente le nombre de « paraspeckles » formés et retient des ARNm dans le noyau. *Neat1* incorpore les protéines p54 et Psp1 dans les « paraspeckles ».

Issue de Beermann *et al.*, 2016.

développement du cerveau (Ang *et al.*, 2020). On comprend cependant le rôle fondamental des lncARNs et la nécessité de leur régulation fine afin d'éviter le développement de certaines maladies. Il y a donc un intérêt majeur dans l'étude des lncARNs afin de comprendre davantage leur fonction dans les différents organes dont le testicule.

C. Les lncARNs dans le testicule

Les testicules et le cerveau sont les organes avec la plus forte expression de lncARNs (Cabili *et al.*, 2011; Necsulea *et al.*, 2014; Sarropoulos *et al.*, 2019; Soumillon *et al.*, 2013).

Chez l'homme, l'étude de Cabili *et al.* (2011) avait mis en évidence que sur 4662 lncARNs identifiés, 1/3 sont spécifiquement exprimés dans le testicule. Des études plus récentes mettent également en évidence que l'expression maximum des lncARNs dans les testicules représente plus de 1/3 des lncARNs totaux exprimés chez l'homme (Necsulea *et al.*, 2014) et la souris (Sarropoulos *et al.*, 2019).

Les technologies récentes de NGS ont permis de mettre en évidence de nombreux lncARNs dans les testicules, notamment chez la souris. Ces lncARNs sont majoritairement exprimés dans les cellules germinales post-méiotiques (spermiogénèse), stades d'intenses régulations post-transcriptionnelles (Li *et al.*, 2020; Trovero *et al.*, 2020).

La forte proportion de lncARN exprimés spécifiquement dans les testicules soulève la question de savoir si la transcription de ces lncARNs est régulée ou s'il s'agit d'une transcription non spécifique des lncARNs au niveau des régions ouvertes de la chromatine lors de la formation des gamètes. L'occurrence des sites de liaison aux facteurs de transcription peut être un indicateur de la régulation active des gènes. En croisant les données des sites de liaison et les données de ChIP-seq sur les domaines de liaison des facteurs de transcription, il a été mis en évidence que les promoteurs des lncARNs s'associent plus fréquemment à des facteurs de transcription que les régions intergénomiques aléatoires (Necsulea *et al.*, 2014). Ainsi la transcription des lncARNs dans les tissus comprenant le testicule semblent activement régulée.

Des lncARNs ont été étudiés durant la méiose chez la drosophile et la levure. Chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), des gènes inducteurs de la méiose tels que *IME1* (pour *inducer of meiosis 1*) et *IME4* voient leurs expressions régulées respectivement par les lncARNs *IRT1* (pour *IME1 regulatory transcript*), localisé sur le promoteur du gène *IME1*, et *RME2* (pour *regulator of meiosis 2*) (Gelfand *et al.*, 2011; van Werven *et al.*, 2012). La transcription du lncARN *IRT1* empêche l'expression du gène *IME1* et recrute des éléments répresseurs de la chromatine : ce lncARN inhibe l'initiation de la méiose (van Werven *et al.*, 2012). De façon similaire, le lncARN *RME2* est transcrit à partir de

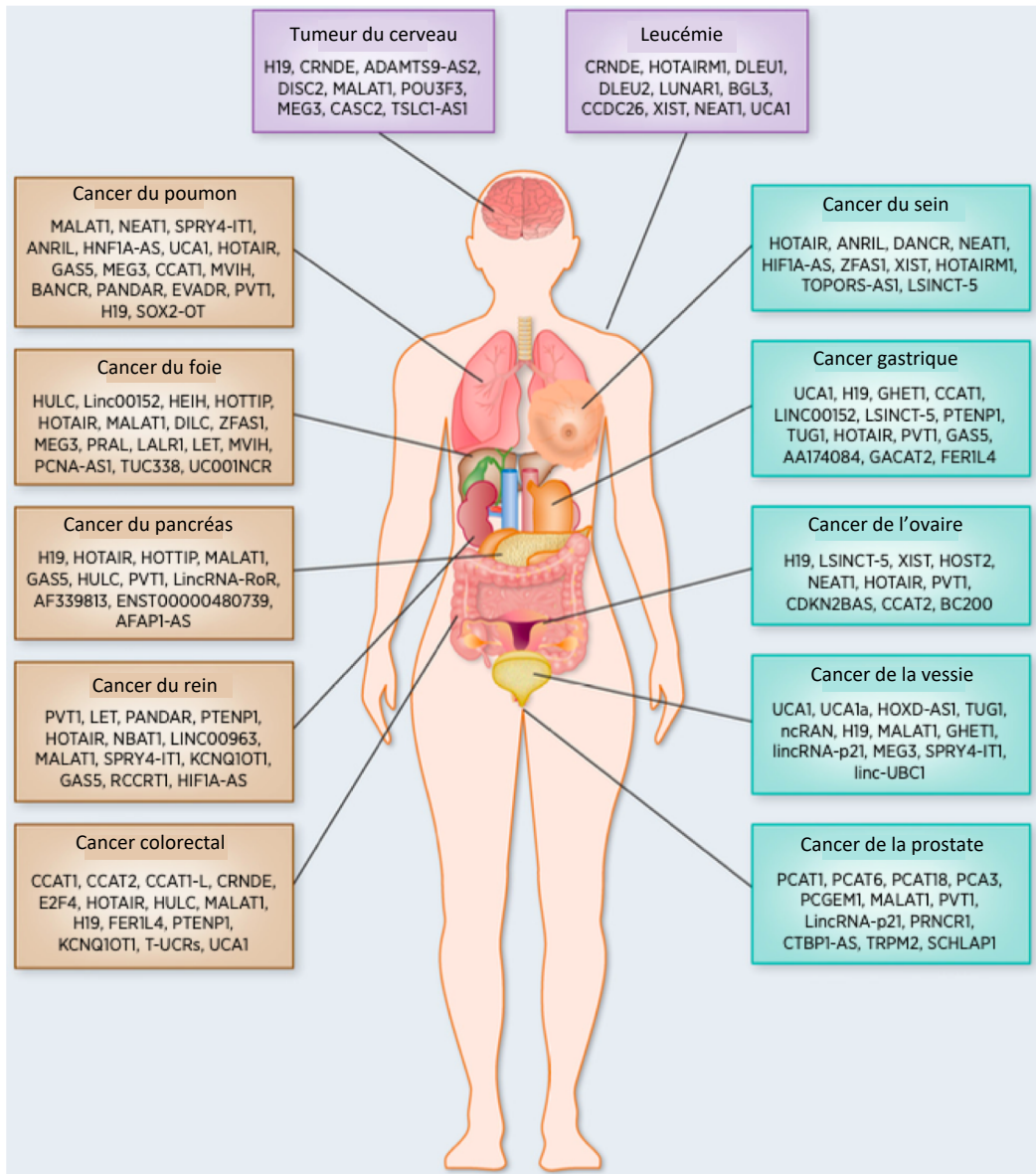


Figure 41 : Les lncARNs associés à différents types de cancers.

Bhan *et al.*, 2017.

l'extrémité 3' du gène *IME4* et empêche l'expression de ce gène (Gelfand *et al.*, 2011). Ainsi ces deux lncARNs répriment l'entrée en méiose des levures en empêchant l'expression des gènes induisant la méiose. Chez la drosophile, l'orthologue de *IME4*, nommé *METTL3* (pour *methyltransferase-like 3*) présente un rôle essentiel dans la gamétogenèse et la viabilité des embryons (Hongay and Orr-Weaver, 2011; Taylor *et al.*, 2015). Ainsi, ces lncARNs présentent des fonctions importantes pour la gamétogenèse voire la méiose dans les organismes comme la levure et la drosophile.

Chez les mammifères, des lncARNs jouent également un rôle prépondérant dans le testicule et donc la spermatogenèse et la fertilité masculine. Quelques lncARNs laissent supposer des fonctions primordiales dans l'initiation et la réalisation de la méiose (**Figure 42**).

Le gène *Dmrt1i* (pour *Dmrt1 interacting* aussi appelé *Dmr*) est un lncARN spécifique du testicule, capable de réaliser un trans-épissage avec l'ARN *Dmrt1* (Zhang *et al.*, 2010), facteur clé de la différenciation gonadique (voir la partie **Introduction.I.B.3.a.iii**). *Dmrt1* favorise également le développement des spermatogonies et empêche une méiose prématurée dans les spermatogonies en réprimant *Stra8* (Matson *et al.*, 2011). Le lncARN *Dmrt1i* est peu conservé, avec une homologie retrouvée seulement entre rat et souris. *Dmrt1i* est localisé sur le chromosome 5 alors que *Dmrt1* est localisé sur le chromosome 19 chez la souris. Le trans-épissage des deux ARNm forme un ARNm chimérique. Chez la souris, la surexpression *in vitro* de *Dmrt1i* dans des cellules de Sertoli primaires entraîne une augmentation du trans-épissage *Dmrt1i-Dmrt1* qui a pour conséquence de diminuer l'expression de l'ARNm et de la protéine DMRT1 normale. Cette forme chimérique de l'ARNm est le résultat de la perturbation de la région codante du gène *Dmrt1* et du remplacement de sa région 3'UTR, pour générer une protéine DMRT1 tronquée qui ne contient qu'un seul domaine DM de liaison à l'ADN (Zhang *et al.*, 2010). Ainsi, l'expression de *Dmrt1i* empêche l'action de *Dmrt1* via le trans-épissage suggérant une régulation négative dans le développement des spermatogonies (Zhang *et al.*, 2010). *Dmrt1* empêche une méiose trop précoce en réprimant *Stra8* dans les spermatogonies, le lncARN *Dmrt1i* pourrait aussi avoir un rôle dans la régulation de la méiose de ces cellules germinales.

Le gène *Mrhl* (pour *Meiotic recombination hot spot locus*) est un lncARN intronique de 2,4 kb situé sur le chromosome 8 chez la souris au niveau du locus « hot spot » des recombinaisons méiotiques. Il est situé dans un intron du gène *Phkb* (*phosphorylase kinase beta*). Chez la souris, il est polyadénylé, n'est pas épissé et possède une localisation nucléaire dans plusieurs tissus dont les testicules (Ganesan and Rao, 2008; Nishant *et al.*, 2004) et plus précisément dans les cellules germinales (Kataruka *et al.*, 2017). Une sous-expression de *Mrhl* dans la lignée cellulaire GC-1-spg murine (dérivé de spermatogonies) a été réalisée par ajout de siARN dirigés contre *Mrhl* (sans modification de l'expression de *Phkb*). L'étude du transcriptome de ces cellules a montré que l'absence

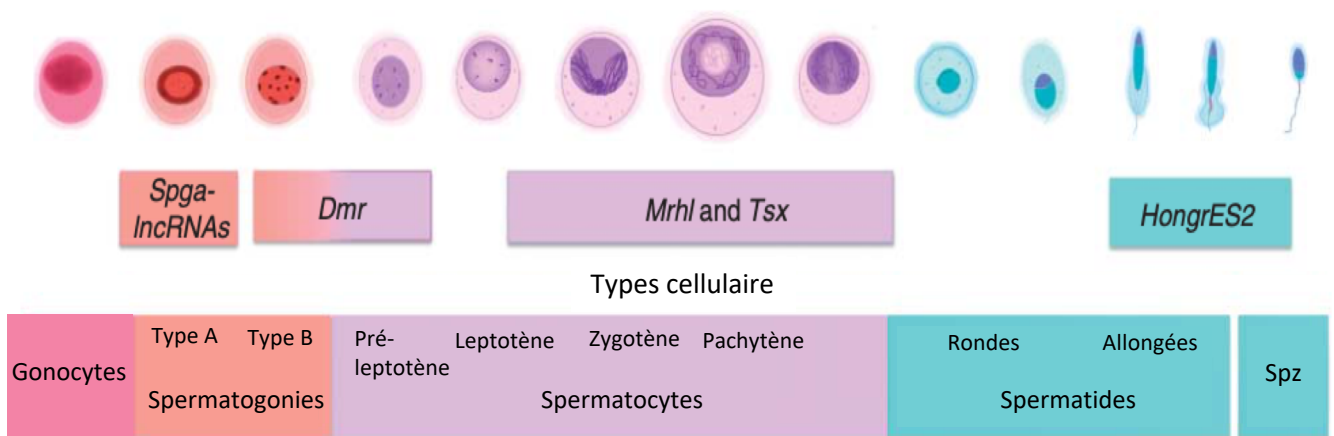


Figure 42 : Exemple de lncARNs ayant un rôle décrit au cours de la spermatogénèse des mammifères.

Luk *et al.*, 2014

de transcrit *Mrhl* perturbe la voie de signalisation Wnt en interagissant avec DDX5 (pour *Dead box helicase 5* ou p68) (Arun *et al.*, 2012). *Mrhl* empêcherait la translocation de la β -caténine dans le noyau en retenant DDX5 dans le noyau (Arun *et al.*, 2012). La signalisation Wnt est activée dans les spermatogonies alors qu'elle est inhibée dans les spermatocytes en méiose (Kerr *et al.*, 2014). Aussi, en inhibant la signalisation Wnt, *Mrhl* régule positivement la différenciation des spermatocytes. La fonction spécifique de *Mrhl* dans les spermatocytes doit encore être démontrée *in vivo* par l'utilisation notamment d'un modèle de souris knockout par exemple.

Tsx (pour *Testis-specific X-linked*), situé au niveau du locus Xist, est un lncARN peu conservé chez les mammifères euthériens (Chureau *et al.*, 2002). Ce lncARN est largement exprimé dans les tissus de souris adultes mais la plus forte expression revient aux cellules germinales des testicules. *Tsx* présente une expression majoritaire dans les spermatocytes en pachytène (Anguera *et al.*, 2011) et se situe sur un loci qui échappe au MSCI (Namekawa *et al.*, 2006). La délétion de ce gène chez la souris, entraîne une apoptose importante des cellules germinales mâles à 14jpp bien que les souris *Tsx*^{-/-} soient fertiles (Anguera *et al.*, 2011). Ces résultats indiquent que *Tsx* jouerait un rôle lors de l'entrée des cellules germinales en prophase de méiose I. Le mécanisme d'action de *Tsx* reste à découvrir.

Le lncARN *Tcam1* (pour testicular cell adhesion molecule 1) est exclusivement exprimé dans les cellules germinales mâles de souris et jouerait un rôle crucial dans la méiose. En effet, il régule les gènes liés au système immunitaire dans les cellules germinales de souris (Kurihara *et al.*, 2017). Il a été montré que l'induction de la transcription de *Tcam1* dans des cellules GC-2spd(ts) entraîne l'expression des gènes associés à la réponse immunitaire, suggérant que ce lncARN *Tcam1* régule les gènes liés au système immunitaire au cours de la spermatogenèse.

Par ailleurs, d'autres lncARNs spécifiquement exprimés dans le testicule ne semblent pas être indispensable pour la fertilité des mâles. Chez la drosophile, 105 lncARNs, exprimés de façon spécifique dans le testicule, ont été délétés. La délétion de seulement 32 lncARNs sur 105 (soit 30%) entraîne une réduction de la fertilité des mâles KO (Wen *et al.*, 2016).

Dans le testicule murin, Li *et al.* (2021) ont identifiés 8941 lncARNs exprimés dans les cellules germinales durant la spermatogenèse. Parmi ces lncARNs, 968 ont été identifiés comme impliqués dans le développement des cellules germinales (Li *et al.*, 2021). Cette étude met en évidence une corrélation (positive ou négative) entre l'expression de ces 968 lncARNs avec l'expression de gènes codants pour des protéines qui sont critiques pour la spermatogenèse. Ces observations suggèrent un rôle de ces lncARNs dans la régulation de la spermatogenèse.

Un criblage des lncARNs pour sélectionner les lncARNs avec un rôle potentiel a généré une liste de 27

lncARNs. Parmi eux, les lncARNs *1700027A15Rik* et *Gm4665* présente une fonction importante au cours de la spermatogenèse. En effet, la sous-expression d'un de ces lncARNs par shARN entraîne des anomalies au cours de la spermatogenèse avec une perte des cellules germinales (Li *et al.*, 2021). Ainsi, cette étude met en évidence le rôle primordial des lncARNs au cours de la spermatogenèse.

D'autres études avec des lignées de souris KO pour un lncARN n'ont pas mis en évidence d'anomalie de la spermatogenèse. Par exemple, la délétion par CRISPR/Cas9 des lncARNs *1700121C10Rik* (Li *et al.*, 2020), *lncRNA5512* (Zhu *et al.*, 2020) n'affecte pas la fertilité et la motilité des spermatozoïdes chez les souris. Ces observations montrent que certains lncARNs ne sont pas indispensables pour la fertilité chez les souris mâles malgré une forte expression dans les cellules germinales. L'absence de phénotype peut être due à une absence de fonction du lncARN, mais il peut également être due à des redondances fonctionnelles entre lncARNs et/ou des phénomènes compensatoires. La fonction de certains lncARNs pourrait aussi être observée uniquement dans des conditions de stress particulières. Enfin, le phénotype peut également avoir une pénétrance partielle et donc compliquer l'étude des phénotypes et du rôle des lncARNs. L'absence de phénotype ne signifie pas que les lncARNs n'ont aucun rôle.

Beaucoup de lncARNs testiculaires restent à étudier pour déterminer leur rôle dans la mise en place de la fertilité mâle. L'accès aux techniques de séquençage à haut débit a permis de grandes avancées dans la découverte des lncARNs. Les mutations par CRISPR/Cas9 sont également un outil facilitant la création de nouvelles lignées de souris afin de déterminer le rôle de ces lncARNs. Néanmoins, la diversité des mécanismes d'action ainsi que leur plus faible niveau d'expression par rapport aux ARNm compliquent la caractérisation et l'étude de ces transcrits.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE THESE

La recherche des gènes impliqués dans la différenciation ovarienne chez la brebis constitue l'origine de ce travail. Le développement précoce d'un ovaire comporte trois étapes clés:

- la différenciation de la gonade bipotentielle en ovaire et la multiplication des cellules germinales,
- l'entrée en méiose des ovogonies et leur blocage en diplotène de prophase I,
- et la formation des follicules ovariens.

Aussi, des banques d'ovaires fœtaux ovins ont été générées au laboratoire par la technique d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH), à partir d'ovaires fœtaux de brebis de 55 *jpc* et 82 *jpc*. Ces stades correspondent respectivement à l'entrée en prophase I des ovogonies (banque "Méiose") et à la formation des follicules primordiaux (banque "Folliculo") (Baillet *et al.*, 2008). Une séquence EST (pour *Expressed Sequence Tag*) a attiré l'attention du laboratoire car cet EST n'était retrouvé dans les bases de données publiques que dans des banques d'ADNc préparées à partir de testicules mâles humains ou murins adultes et à partir d'ovaires de souris à la naissance. L'ADNc a été caractérisé au laboratoire dans les espèces ovine et murine. L'analyse de la séquence protéique putative contient un domaine PAZ (pour *Piwi/Argonaute/Zwille*) et un domaine CCCH en doigt de zinc. Le gène ainsi identifié a été nommé TOPAZ1 pour *Testis and Ovary specific PAZ domain gene 1* (Baillet *et al.*, 2011b).

Ce gène est hautement conservé chez les vertébrés. Il possède 20 exons qui codent pour une protéine putative de 1701, 1653 et 1692 acides aminés respectivement chez le mouton, la souris et l'Homme. La présence du domaine CCCH en doigt de zinc suggère que TOPAZ1 pourrait fonctionner comme une protéine de liaison aux ARNs (Hall, 2005).

Chez le mouton, le gène *TOPAZ1* est exprimé uniquement dans l'ovaire fœtal, majoritairement au cours de l'initiation de la méiose, et dans le testicule adulte (**Figure 43A**). Chez la souris, *Topaz1* est exprimé uniquement majoritairement dans le testicule adulte (**Figure 43B**), dans les cellules germinales (Baillet *et al.*, 2011). Tous ces premiers résultats ont fait l'objet du travail de thèse d'Adrienne Baillet.

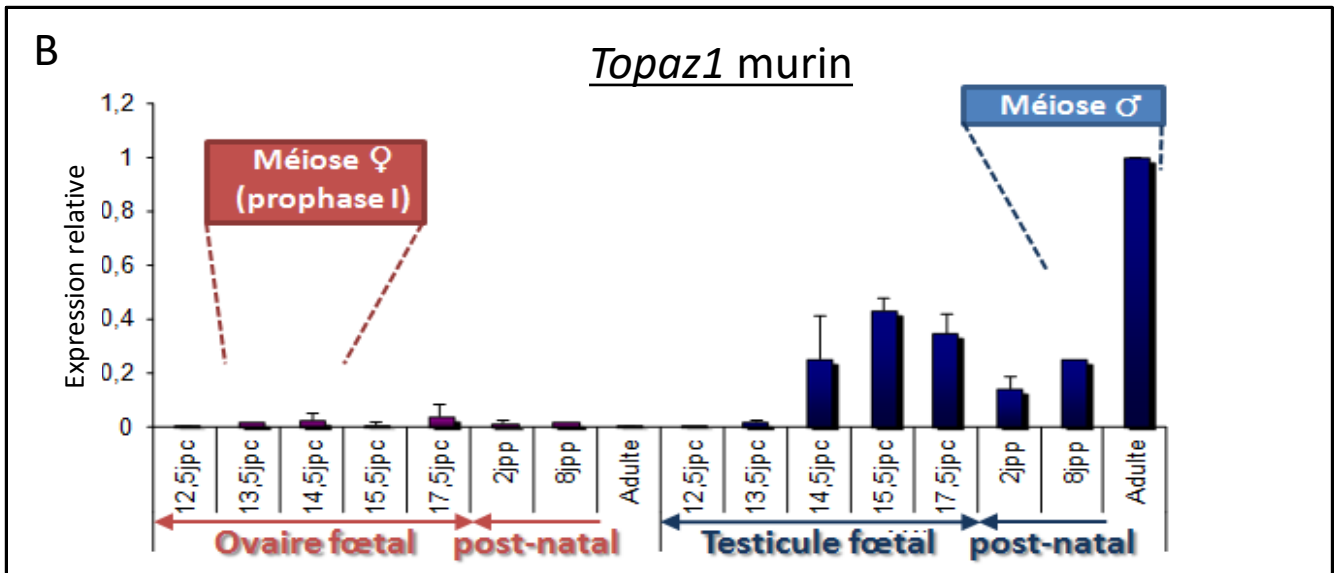
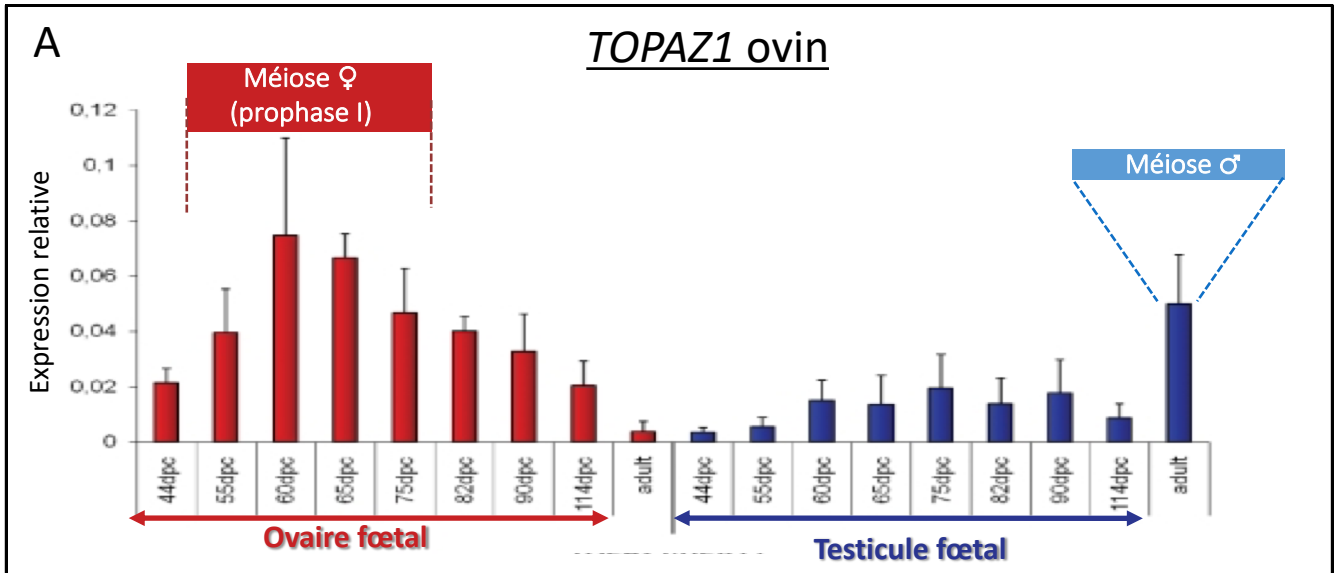


Figure 43 : Profil d'expression de *TOPAZ1/Topaz1* dans les gonades ovines et murines.

Evaluation de l'expression relative du gène *TOPAZ1/Topaz1* par RT-qPCR à différents stades du développement fœtal jusqu'à l'âge adulte dans l'espèce ovine (A) et murine (B). Les histogrammes représentent l'expression de *TOPAZ1/Topaz1* dans l'ovaire (rouge) et le testicule (bleu).

De Baillet *et al.*, 2011 et données du laboratoire.

Pour étudier le rôle de *Topaz1*, une lignée de souris invalidée pour ce gène (nommée *Topaz1*^{-/-}) a été réalisée par l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg). Les souris *Topaz1*^{-/-} se développent normalement et sont fertiles à l'exception des mâles qui sont stériles (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015). Chez les mâles, le poids et la taille des testicules sont significativement plus petits dès 28jpp. L'analyse histologique des testicules ne montre aucune différence entre les animaux KO et normaux jusqu'à 28 jours après la naissance ; puis une altération progressive des tubes séminifères est observée, conduisant à une absence totale de production de spermatozoïde chez les mâles adultes *Topaz1*^{-/-}. Par hybridation *in situ* (HIS), chez les animaux normaux (WT) l'expression de *Topaz1* dans les cellules germinales a pu être localisée spécifiquement dans le cytoplasme des spermatocytes. Comme attendu, aucun signal n'a pu être observé dans les testicules *Topaz1*^{-/-} (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015). Ces données suggèrent que *Topaz1* joue un rôle majeur dans la différenciation des spermatocytes, et probablement au cours de la première vague de méiose. Pour déterminer le stade précis d'arrêt de méiose dans les spermatocytes *Topaz1*^{-/-}, l'expression de plusieurs gènes spécifiques des différents stades de méiose I a été étudiée par RT-qPCR chez ces souris. Le gène *Spo11* spécifique des spermatocytes au stade leptotène/zygotène (**partie Introduction.II.B.2.a.ii**) est exprimé de façon identique dans les testicules WT et *Topaz1*^{-/-}. En revanche, des gènes spécifiques du stade pachytène (*HoxA4*, *Hist1h1*, *Cdc25*) sont significativement moins exprimés dans les testicules KO que dans les WT et des gènes spécifiques de cellules germinales haploïdes (*Prm1*, *Akap4*) ne sont pas exprimés dans les testicules de souris *Topaz1*^{-/-}. Par immunofluorescence, la protéine EZH2, une méthyltransférase spécifique des spermatides rondes, n'est pas détectée dans ces testicules mutants. Ainsi, l'absence d'expression du gène *Topaz1* s'accompagne d'un arrêt du déroulement de la méiose avant la première division et les cellules germinales bloquées dégèrent par apoptose. Ces observations sont confirmées par histologie : dans les spermatocytes *Topaz1*^{-/-}, les chromosomes ne sont pas alignés correctement le long de la plaque métaphasique comme chez les WT (**Figure 44**) (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015).

Afin de rechercher le point de blocage méiotique précis avant la première division, différents points de contrôle ont été analysés:

- La mise en place du complexe synaptonémal et celle du MSC1 (**partie Introduction.II.B.2.a.iii**), attestées notamment par observation immunohistologique du complexe synaptonémal par SYCP3 et du corps XY par γ H2AX, sont normales (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015).
- Plusieurs modèles de souris knockout, montrant un arrêt méiotique au cours de la spermatogenèse, présentent une dérégulation des rétrotransposons (cas des KO de *Mov10l1*, *Mitopl1d*, *Mili*, *Miwi2*, *Ddx4* (aussi appelé *Mvh*)) (Carmell *et al.*, 2007; Deng and

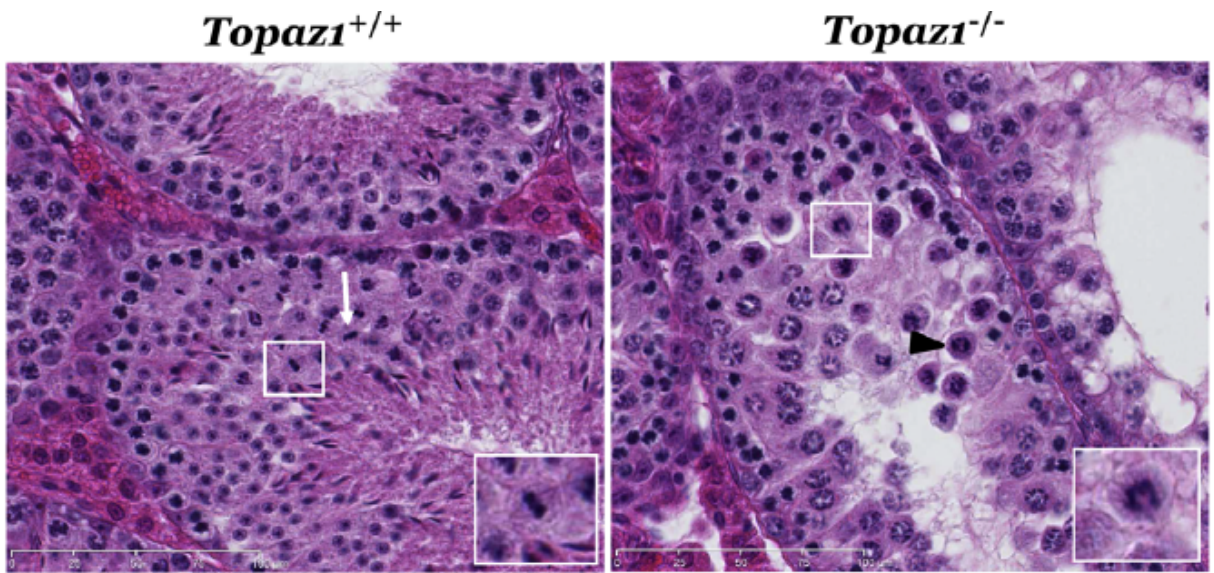


Figure 44 : Coloration Hématoxyline et éosine de coupes de testicules issus de souris **Topaz1^{+/+}** et **Topaz1^{-/-}**.

Le testicule adulte **Topaz1^{+/+}** met en évidence des spermatocytes en métaphase de méiose I avec les chromosomes alignés le long de la plaque métaphasique. Dans les testicules **Topaz1^{-/-}** les spermatocytes I présentent des défauts d'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. Barre d'échelle : 50µm.

Issue de Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015.

Lin, 2002; Frost *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2011). L'absence de TOPAZ1 ne modifie pas l'expression des rétrotransposons. TOPAZ1 ne semble donc pas impliqué leurs régulations (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015).

Dans le but de déterminer les voies de régulation perturbées en absence de Topaz1, une analyse transcriptomique par microarray (puce whole génome murine) a été réalisée à partir d'ARN issus de testicules *WT* et *Topaz1*^{-/-} (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015) de 15 et 20 *jpp* : ces deux stades correspondent respectivement au stade pachytène des spermatocytes et au stade post méiotique. Les résultats ont mis en évidence qu'un seul gène était différentiellement exprimé à 15 *jpp*, le gène *Topaz1*. En réduisant la stringence des analyses, à 15 *jpp*, le transcrite *4930463O16Rik* (répertorié comme un lncARN) est également dérégulé en absence de Topaz1. Au stade 20 *jpp*, 99 gènes sont significativement dérégulés dont 10% sont des lncARNs (incluant *4930463O16Rik*).

Des expériences d'*HIS* ont mis en évidence que ce lncARN est spécifique des spermatocytes et n'est plus observable dans les cellules germinales *Topaz1*^{-/-} (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015). Ce lncARN a également été retrouvé dérégulé dans d'autres cas d'infertilité masculine chez les souris mutés pour les gènes *MYBL1* et *MOV10L1* (Bolcun-Filas *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2010). L'utilisation du logiciel RPISeq de prédiction des interactions ARN-protéine suggère que le lncARN *4930463O16Rik* pourrait d'interagir avec les protéines *MYBL1*, *MOV10L1* et *TOPAZ1* (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015).

Les études précédentes ont donc permis de démontrer que *Topaz1* est un gène indispensable pour la spermatogenèse murine : il est nécessaire pour la transition de prophase I-métaphase I de méiose. L'ensemble de ce travail sur la caractérisation de la lignée murine *Topaz1*^{-/-} a fait l'objet du travail de thèse d'Alix Luangpraseuth-Prosper.

A partir de là, mon travail de thèse a donc comporté trois objectifs principaux qui sont :

- La poursuite de la caractérisation du blocage méiotique des souris *Topaz1*^{-/-}.
- L'étude des transcrits dérégulés dans les testicules de souris *Topaz1*^{-/-} par une analyse de séquençage haut débit, permettant d'avoir une représentation de tous les transcrits testiculaires.
- La détermination du rôle du lncARN *4930463O16Rik* grâce à la création et l'étude d'une nouvelle lignée de souris dépourvue de ce gène.

Différentes techniques d'analyses de l'expression des gènes par RNA-seq et RT-qPCR ainsi que différentes techniques d'histologie, d'immunofluorescence, d'hybridation *in situ* ont été mises en place pour répondre à ces différentes problématiques.

ARTICLE

***Topaz1*, an essential gene for murine spermatogenesis,
down-regulates the expression of many testis-specific long non-coding RNAs.**

Manon Chadourne, Elodie Pומרol, Luc Jouneau, Bruno Passet, Johan Castille, Eli Sellem,
Eric Pailhoux and Béatrice Mandon-Pépin

Cet article est soumis à "Frontiers in cell and developmental biology".

Topaz1, an essential gene for murine spermatogenesis, down-regulates the expression of numerous testis-specific long non-coding RNAs

1 Manon Chadourne¹, Elodie Poumerol¹, Luc Jouneau¹, Bruno Passet², Johan Castille², Eli
2 Sellem³, Eric Pailhoux¹, Béatrice Mandon-Pépin^{1*}

3 ¹Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France

4 ²Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, Jouy-en-Josas, France

5 ³R&D Department, ALLICE, Paris, France

6

7 * Correspondence:

8 Béatrice Mandon-Pépin

9 beatrice.mandon-pepin@inrae.fr

10 **Keywords:** *Topaz1*, Spermatogenesis, Meiosis, Germ cells, Mouse, LncRNAs.

11

12 Abstract

13 Spermatogenesis involves coordinated processes, including meiosis, to produce functional gametes.
14 We previously reported *Topaz1* as a germ cell-specific gene highly conserved in vertebrates. *Topaz1*
15 knockout males are sterile with testes that lack haploid germ cells because of meiotic arrest after
16 prophase I. To better characterize *Topaz1*^{-/-} testes, we used RNA-sequencing analyses at two different
17 developmental stages (P16 and P18). The absence of TOPAZ1 disturbed the expression of genes
18 involved in microtubule and/or cilium mobility, which was consistent with testicular histology
19 showing the disruption of microtubules and centrosomes. Moreover, a quarter of P18 dysregulated
20 genes are long non-coding RNAs (lncRNAs), and three of them are testis-specific and located in
21 spermatocytes, their expression starting between P11 and P15. The suppression of one of them,
22 *4939463O16Rik*, did not alter fertility although sperm parameters were disturbed and sperm
23 concentration fell. The transcriptome of P18-*4939463O16Rik*^{-/-} testes was altered and the molecular
24 pathways affected included microtubule-based processes, the regulation of cilium movement and
25 spermatogenesis. The absence of TOPAZ1 protein or *4930463O16Rik* produced the same enrichment
26 clusters in mutant testes despite a contrasted phenotype on male fertility. In conclusion, TOPAZ1
27 appeared to stabilize the expression of numerous lncRNAs. Its suppression is not essential for
28 fertility but required during the terminal differentiation of male gametes.

29

30 1 Introduction

31 In mammals, an organism derives from two parental haploid gametes, a maternal oocyte and paternal
32 sperm. Meiosis is a highly specialized event that leads to the production of these haploid germ cells
33 (Kleckner, 1996). In females, meiosis is initiated during fetal life while male germ cells are involved
34 in the meiosis process around puberty. In males, meiosis is essential during spermatogenesis that

35 involves mitotic division and the multiplication of spermatogonia, the segregation of homologous
 36 chromosomes and the spermiogenesis of haploid germ cells. This complex process of
 37 spermatogenesis, which progresses through precisely timed and highly organized cycles, is
 38 primordial for male fertility. All these different events are highly regulated and associated with the
 39 controlled expression of several testis-enriched genes. A previous study had demonstrated the
 40 essential role of *Topaz1* during meiosis in male mice (Luangpraseuth-Prosper et al., 2015). *Topaz1* is
 41 a highly conserved gene in vertebrates (Baillet et al., 2011). Its expression is germ cell-specific in
 42 mice (Baillet et al., 2011). The suppression of *Topaz1* in mice (*Topaz1*^{-/-}) results in azoospermia
 43 (Luangpraseuth-Prosper et al., 2015). Male meiotic blockage occurs without a deregulation of
 44 chromosome alignment and TOPAZ1 is not involved in formation of the XY body or the
 45 maintenance of MSCI (Meiotic Sex Chromosome Inactivation). *Topaz1* depletion increases the
 46 apoptosis of mouse adult male pachytene cells and triggers chromosome misalignment at the
 47 metaphase I plate in mouse testes (Luangpraseuth-Prosper et al., 2015). This misalignment leads to
 48 an arrest at the prophase to metaphase transition during the first meiosis division (Luangpraseuth-
 49 Prosper et al., 2015). Microarray-based gene expression profiling of *Topaz1*^{-/-} mouse testes revealed
 50 that TOPAZ1 influences the expression of one hundred transcripts, including several long non-
 51 coding RNA (lncRNAs) and unknown genes, at postnatal day 20 (P20) (Luangpraseuth-Prosper et
 52 al., 2015).

53 Since discovery of the maternal *H19* lncRNA (Brannan et al., 1990) and the *Xist* (Brockdorff et al.,
 54 1992) genes that regulate the structure of chromosomes and mediate gene repression during X
 55 chromosome inactivation, interest in studying the role of non-coding RNAs (ncRNAs) has grown
 56 considerably. Non-coding RNAs are present in many organisms, from bacteria to humans, where
 57 only 1.2% of the human genome codes for functional proteins (Carninci et al., 2005; ENCODE
 58 Project Consortium et al., 2007; Gil and Latorre, 2012). While much remains to be discovered about
 59 the functions of ncRNAs and their molecular interactions, accumulated evidence suggests that
 60 ncRNAs participate in various biological processes such as cell differentiation, development,
 61 proliferation, apoptosis and cancers.

62 They are divided into two groups: small and long non-coding RNAs (sncRNAs and lncRNAs,
 63 respectively). SncRNAs contain transcripts smaller than 200 nucleotides (nt). They include
 64 microRNAs (miRNAs, 20-25 nt), small interfering RNAs (siRNAs), PIWI-interacting RNAs
 65 (piRNAs, 26-31 nt) and circular RNAs (cricRNA). These sncRNAs are essential for several functions
 66 such as the regulation of gene expression and genome protection (Ref in (Morris and Mattick, 2014))
 67 as well as during mammalian spermatogenesis (Yadav and Kotaja, 2014; Bie et al., 2018; Quan and
 68 Li, 2018). The second group, lncRNAs, contains transcripts longer than 200 nt without a significant
 69 open reading frame. Advances in high-throughput sequencing have enabled the identification of new
 70 transcripts, including lncRNAs, most of which are transcribed by RNA polymerase II and possess a
 71 5' cap and polyadenylated tail (ref in (Jarroux et al., 2017)). They are classified according to their
 72 length, location in the genome (e.g. surrounding regulatory elements) or functions.

73 Several studies have pointed out that testes contain a very high proportion of lncRNA compared to
 74 other organs (Necsulea and Kaessmann, 2014; Sarropoulos et al., 2019). However, this high testicular
 75 expression is only observed in the adult organ, as the level of lncRNAs in the developing testis is
 76 comparable to that seen in somatic organs (Sarropoulos et al., 2019). In mice, some testis-expressed
 77 lncRNAs were functionally characterized during spermatogenesis. Thus, the lncRNA *Mrhl* repressed
 78 *Wnt* signaling in the Gc1-Spg spermatogonial cell line, suggesting a role in spermatocyte
 79 differentiation (Arun et al., 2012). Expression of the Testis-specific X-linked gene was specific to,
 80 and highly abundant in, mouse pachytene-stage spermatocytes and could regulate germ cell

81 progression in meiosis (Anguera et al., 2011). Moreover, in male germ cells, it has been shown that
82 the *Dmrt1*-related gene negatively regulates *Dmrt1* (doublesex and mab-3 related transcription factor
83 1) and that this regulation might be involved in the switch between mitosis and meiosis in
84 spermatogenesis (Zhang et al., 2010). Lastly, in a non-mammalian model as *Drosophila*, Wen *et al.*
85 produced mutant fly lines by deleting 105 testis-specific lncRNAs and demonstrated the essential
86 role of 33 of them in spermatogenesis and/or male fertility (Wen et al., 2016).

87 Following a previous study, which presented comparative microarray analyses of wild-type
88 and *Topaz1*^{-/-} testis RNAs at P15 and P20 (Luangpraseuth-Prosper et al., 2015), we have now
89 performed deep sequencing by bulk RNA-sequencing (RNA-seq) of these testes collected at P16 and
90 P18 in an aim to refine the developmental stages that display transcriptional differences between the
91 two mouse lines. Since the proportion of deregulated lncRNAs represented about a quarter of the
92 differentially expressed genes (DEGs), we studied the testicular localization of three of them. In
93 order to approach the role of testicular lncRNAs, we created a mouse line in which one of them was
94 deleted (*4930463O16Rik*). These knockout mice displayed normal fertility in both sexes, but the
95 male mutants produced half as much sperm as wild-type controls.

96

97 **2 Materials and Methods**

98 **2.1 Ethics statement**

99 All animal experiments were performed in strict accordance with the guidelines of the Code for
100 Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals (Directive 2016/63/UE).
101 All experiments were approved by the INRAE Ethical Committee for Animal Experimentation
102 covering Jouy-en-Josas (COMETHEA, no. 18-12) and authorized by the French Ministry for Higher
103 Education, Research and Innovation (No. 815-2015073014516635).

104 **2.2 Mice**

105 The generation and preliminary analysis of *Topaz1*-null transgenic mouse line has been described
106 previously (Luangpraseuth-Prosper *et al.* 2015).

107 Generation of the *4630493O16Rik*-null transgenic mouse line was achieved using CrispR-Cas9
108 genome editing technology. The RNA mix comprised an mRNA encoding for SpCas9-HF1 nuclease
109 and the four sgRNA (Supplementary Table 4) targeting the *4930463o16Rik* gene (NC_000076:
110 84324157-84333540). These sgRNAs were chosen according to CRISPOR software
111 (<http://crispor.tefor.net/>) in order to remove the four exons and introns of the *4930463o16Rik* gene.
112 Cas9-encoding mRNA and the four sgRNAs were injected at a rate of 100 ng/μL each into one cell
113 fertilized C57Bl/6N mouse eggs (Heno-Mejia et al., 2016). The surviving injected eggs were
114 transferred into pseudo-pregnant recipient mice. Tail-DNA analysis of the resulting live pups was
115 performed using PCR with genotyping oligonucleotides (Supplementary Table 4) and the Takara Ex
116 Taq® DNA Polymerase kit. The PCR conditions were 94 °C 30s, 60 °C 30s and 72 °C 30s, with 35
117 amplification cycles. Two transgenic founder mice were then crossed with wild-type C57Bl/6N mice
118 to establish transgenic lines. F1 heterozygote mice were crossed together in each line to obtain F2
119 homozygote mice, thus establishing the *4630493O16Rik*^{-/-} mouse lines. Both mouse lines were fertile
120 and the number of pups was equivalent, so we worked with one mouse line.

121 All mice were fed *ad libitum* and were housed at a temperature of 25°C under a 12h/12h light/dark
122 cycle at the UE0907 unit (INRAE, Jouy-en-Josas, France). The animals were placed in an enriched
123 environment in order to improve their receptiveness while respecting the 3R. All mice were then
124 sacrificed by cervical dislocation. Tissues at different developmental stages were dissected and fixed
125 as indicated below, or flash frozen immediately in liquid nitrogen before storage at -80°C. The frozen
126 tissues were used for the molecular biology experiments described below.

127 2.3 Histological and immunohistochemical analyses

128 For histological studies, fresh tissues from 8-week-old mice were fixed in 4% paraformaldehyde
129 (Electron Microscopy Sciences reference 50-980-495) in phosphate buffer saline (PBS) at 4°C. After
130 rinsing the tissues in PBS, they were stored in 70% ethanol at 4°C. Paraffin inclusions were then
131 performed using a Citadel automat (Thermo Scientific Shandon Citadel 1000) according to a
132 standard protocol. Tissues included in paraffin blocks were sectioned at 4µm and organized on
133 Superfrost Plus Slides (reference J1800AMNZ). Once dry, the slides were stored at 4°C. On the day
134 of the experiment, these slides of sectioned tissues were deparaffinized and rehydrated in successive
135 baths of xylene and ethanol at room temperature. For histology, testes sections were stained with
136 hematoxylin and eosin (HE) by the @Bridge platform (INRAE, Jouy-en-Josas) using an automatic
137 Varistain Slide Stainer (Thermo Fisher Scientific). Periodic acid-Schiff staining (PAS) was used to
138 determine seminiferous epithelium stages.

139 *In situ* hybridization experiments were performed using the RNAscope® system (ACB, Bio-Techne
140 SAS, Rennes, France). Briefly, probes (around 1000 nt long) for *Topaz1* (NM_001199736.1),
141 *4930463o16Rik* (NR_108059.1), *Gm21269* (NR_102375.1) and *4921513H07Rik* (NR_153846.1)
142 were designed by ACB and referenced with the catalog numbers 402321, 431411, 549421 and
143 549441, respectively. Negative and positive controls were ordered from ACD with *Bacillus subtilis*
144 dihydrodipicolinate reductase (*dapB*) and *Homo sapiens* ubiquitin C (Hs-UBC), respectively.
145 Hybridization was performed according to the manufacturer's instructions using a labelling kit
146 (RNAscope® 2.5HD assay-brown). Brown labelling slides were counterstained according to a PAS
147 staining protocol and then observed for visible signals. Hybridization was considered to be positive
148 when at least one dot was observed in a cell. Stained sections were scanned using a 3DHISTECH
149 panoramic scanner at the @Bridge platform (INRAE, Jouy-en-Josas) and analyzed with Case Viewer
150 software (3DHISTECH). We also used the RNAscope® 2.5HD assay-red kit in combination with
151 immunofluorescence in order to achieve the simultaneous visualization of RNA and protein on the
152 same slide. The *ISH* protocol was thus stopped by immersion in water before hematoxylin
153 counterstaining. Instead, the slides were washed in PBS at room temperature. The Mouse on mouse
154 (M.O.M.) kit (BMK-2202, Vector laboratories) was used and slides were incubated for one hour in
155 Blocking Reagent, 5 minutes in Working solution and 2 hours with a primary antibody: DDX4
156 (ab13840, Abcam) or γ H2AX(Ser139) (Merck), diluted at 1:200 in Blocking Reagent. Detection was
157 ensured using secondary antibody conjugated to DyLight 488 (green, KPL). Diluted DAPI (1:1000 in
158 PBS) was then applied to the slides for eight minutes. The slides were then mounted with Vectashield
159 Hard Set Mounting Medium for fluorescence H-1400 and images were captured at the MIMA2
160 platform (<https://www6.jouy.inrae.fr/mima2/>, <https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12>)
161 using an inverted ZEISS AxioObserver Z1 microscope equipped with an ApoTome slider, a Colibri
162 light source and AxioCam MRm camera. Images were analyzed using Axiovision software 4.8.2
163 (Carl Zeiss, Germany).

164 2.4 Total RNA extraction and Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

165 Total RNAs from post-natal mouse testes or other organs were isolated using Trizol reagent. The
166 RNAs were purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions
167 and then DNase-treated (Qiagen). The quantification of total RNAs was achieved with a Qbit®
168 Fluorometric Quantitation. Maxima First-Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) was used
169 to reverse transcript RNA into cDNA. The Step One system with Fast SYBR™ Green Master Mix
170 (Applied Biosystems, ThermoFisher France) was used for qPCR, which was performed in duplicate
171 for all tested genes and the results were normalized with qBase⁺ software (Biogazelle) (Hellemans et
172 al., 2007). Gapdh, Ywahz and Mapk1 were used as the reference genes. For each experiment, median
173 values were plotted using GraphPad Prism, and statistical analyses were performed with Kruskal-
174 Wallis tests under R software (Rcmdr package (p-value<0.05)). The primer sequences used for RT-
175 qPCR are shown in Supplementary Table 4.

176 2.5 RNA-sequencing

177 Total RNA quality was verified on an Agilent 2100 Bioanalyser (Matriks, Norway) and samples with
178 a RIN>9 were made available for RNA-sequencing. This work benefited from the facilities and
179 expertise of the I2BC High-throughput Sequencing Platform (Gif-sur-Yvette, Université Paris-
180 Saclay, France) for oriented library preparation (Illumina Truseq RNA Sample Preparation Kit) and
181 sequencing (Paired-end 75 bp; NextSeq). More than 38 million 75 bp paired-end reads per sample
182 were generated.

183 2.6 Transcriptomic analysis

184 Sequence libraries were aligned with the Ensembl 95 genome using TopHat (Trapnell et al., 2009),
185 and gene table counts were obtained by applying featureCounts to these alignments (Liao et al.,
186 2014). Data normalization and single-gene level analyses of differential expression were performed
187 using DESeq2 (Love et al., 2014). Some samples were sequenced several months apart. A batch
188 effect was observed after computation of the hierarchical clustering of samples. In order to take this
189 effect into account, we introduced the batch number into the DESeq2 model, as well as the study
190 conditions. Differences were considered to be significant for Benjamini-Hochberg adjusted p-
191 values <0.05, and absolute fold changes >2 (absolute Log₂FC>1) (Benjamini and Hochberg, 1995).
192 Raw RNA-seq data were deposited via the SRA Submission portal
193 (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>), BioProject ID PRJNA698440.

194 2.7 Biotype determination of DEGs

195 Data available on the NCBI, MGI (<http://www.informatics.jax.org>) and Ensembl
196 (<https://www.ensembl.org/>) websites were used simultaneously to determine the DEG biotypes. For
197 this purpose, information on the mouse genome was obtained by ftp from NCBI
198 (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/gene/DATA/GENE_INFO/Mammalia/Mus_musculus.gene_info.gz); the
199 annotation BioMart file from Ensembl (<http://www.ensembl.org/biomart/martview>; Ensembl genes
200 95, Mouse genes GRCm28.p6) and feature types from MGI (<http://www.informatics.jax.org/marker/>;
201 with the protein coding gene, non-coding RNA gene, unclassified gene and pseudogenic region).
202 Only data corresponding to the DEGs were conserved. The files from these three databases were
203 therefore cross-referenced to determine DEG biotypes. When the biotype of a gene differed between
204 databases, the annotation was then listed as genes with a "biotype conflict".

205 2.8 Gene ontology enrichment

206 The mouse DEGS thus identified were analyzed through Gene Ontology (GO) and Kyoto
 207 Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway membership with Database performed using
 208 the DAVID Bioinformatic Database 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>). These analyses and pathways
 209 were considered to be significant for a Benjamini-corrected enrichment p-value of less than 0.05. The
 210 Mouse Atlas Genome of differentially expressed genes extracted from this study was performed via
 211 the Enrichr website (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>).

212 2.9 Sperm analysis

213 Evaluations of the concentrations and motility of sperm in WT and *4930463O16Rik^{-/-}* 8-week-old
 214 mice were performed using the IVOS II Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) system
 215 (Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA). The two fresh cauda epididymes from each individual were
 216 removed and plunged into 200 μ L TCF buffer (Tris, citrate and fructose buffer) where they were
 217 chopped up with small scissors. For sperm release, the samples were incubated for 10 minutes at
 218 37°C. A 4 μ l aliquot was placed in a standardized four-chamber Leja counting slide (Leja Products
 219 B.V., Nieuw-Vennep, Netherlands). Ten microscope fields were analyzed using the predetermined
 220 starting position within each chamber with an automated stage. Statistical analyses were performed
 221 using the mean of the 10 analyzed fields containing at least 300 cells. The IVOS settings chosen were
 222 those defined for mouse sperm cell analysis (by Hamilton Thorne). The principal parameters were
 223 fixed as follows: 45 frames were captured at 60 Hz; for cell detection, the camera considered a signal
 224 as a spermatozoon when the elongation percentage was between 70 (maximum) and 2 (minimum);
 225 the minimal brightness of the head at 186, and the minimum and maximum size of the head at 7 and
 226 100 μ m², respectively. The kinematic thresholds applied were: cell travel max at 10 μ m, progressive
 227 STR at 45%, progressive VAP at 45 μ m/s, slow VAP at 20 μ m/s, slow VSL at 30 μ m/s, static VAP at
 228 4 μ m/S and static VSL at 1 μ m/s. The full settings used are listed in Supplementary Table 7. The
 229 CASA parameters thus recorded included the average path velocity (VAP in μ m/s), straight line
 230 velocity (VSL in μ m/s), curvilinear velocity (VCL in μ m/s), amplitude of lateral head displacement
 231 (ALH in μ m), motility (percentage), and sperm concentration ($\cdot 10^6$ /mL). Slow cells were recorded as
 232 static. Median and interquartile ranges were plotted with GraphPad. To compare the sperm
 233 parameters between WT and *4930463O16Rik^{-/-}* mice, statistical analyses were performed using the
 234 Kruskal-Wallis non-parametric test.

235

236 3 Results

237 3.1 *Topaz1* mutant testes experience a deregulated transcriptome as early as P16

238 To expand on the previous comparative microarray analyses of wild-type and mutant testes RNA
 239 performed at P15 and P20 during the first wave of spermatogenesis (Luangpraseuth-Prosper et al.,
 240 2015), transcriptomic analyses by RNA-seq were performed on WT and *Topaz1^{-/-}* mouse testes at
 241 two developmental stages: P16 and P18. The P16 stage was chosen because these previous
 242 microarray analyses had revealed that only the *Topaz1* gene was expressed differently at P15, its
 243 expression starting from 5 *dpp*. This means that TOPAZ1 should have had an effect just after P15.
 244 Furthermore, whereas at P15, seminiferous tubules contain spermatocytes that have advanced to mid
 245 and late-pachytene, at P16 they contain spermatocyte cells that have progressed from the end-
 246 pachytene to early diplotene of meiosis I. At P20, the first round spermatids appear, while late-
 247 pachytene spermatocytes are abundant at P18 and the very first spermatocytes II appear (Drumond et
 248 al., 2011). Therefore, the P16 and P18 stages chosen for this study surrounded as closely as possible
 249 the time lapse just before and after the first meiosis I division of spermatogenesis.

250

251 Differential analyses of RNA-seq results revealed that 205 and 2748 genes were significantly
 252 deregulated in *Topaz1*^{-/-} testes compared to WT at P16 and P18, respectively (adjusted p-value
 253 (Benjamini-Hochberg) <0.05 and absolute Log2 Fold Change >1 (Log2FC>1) (Figure 1A,
 254 Supplementary Table 1). At P16, out of the 205 DEGs, 97 genes were significantly down-regulated
 255 (Log2FC<-1 or FC<0.5) and 108 were up-regulated (Log2FC>1 or FC>2). However, at P18, down-
 256 regulated DEGs accounted for 91% (2491 genes) and up-regulated genes for only 9% (257 genes).
 257 Among all these DEGs, 120 were common to both P16 and P18 (Figure 1A). According to the mouse
 258 gene atlas, the 2748 DEGs at developmental stage P18 were largely testis-enriched DEGs in mouse
 259 testis-specific genes (Figure 1B).

260 The validation of several DEGs was achieved using RT-qPCR. Two randomly selected genes up-
 261 regulated at P16 (*B3galt2* and *Hp*) and three at P18 (*B3galt2*, *Afm* and *Cx3cr1*), four gene down-
 262 regulated at P16 and P18 (*Gstt2*, *4930463O16Rik*, *4921513H07Rik* and *Gm21269*) and two non-
 263 differential genes (*Cdc25c* and *Nop10*) were analyzed (Supplementary Figure 1). The results
 264 confirmed those obtained using RNA-seq.

265 The biotypes of the differential transcripts (protein-coding, non-coding RNAs, etc.) were determined
 266 from the annotations of the NCBI, MGI and Ensembl databases. Two major deregulated groups were
 267 highlighted at both stages. The protein-coding gene biotype accounted for half of the deregulated
 268 genes (51.2% and 57.2% at P16 and P18, respectively) (Figure 1C-D). A quarter of *Topaz1*^{-/-} DEGs;
 269 24.9% and 27.9% at P16 and P18, respectively, was found to belong to the second ncRNA group.
 270 Among the latter, the major biotype was lncRNAs at both stages, being 23.4% and 27.1% at P16 and
 271 P18, respectively. This significant proportion of deregulated lncRNA thus raised the question of their
 272 potential involvement in spermatogenesis.

273 3.2 Pathway and functional analysis of DEGs

274 To further understand the biological functions and pathways involved, these DEGs were functionally
 275 annotated based on GO terms and KEGG pathway or on InterPro databases through the ontological
 276 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID v6.8,
 277 <https://david.ncifcrf.gov/>) using the default criteria (Huang et al., 2009a, 2009b).

278 At P16, so therefore before the first meiosis division, out of 205 differentially expressed genes, 32%
 279 of down-regulated and 20% of up-regulated genes corresponded to non-coding RNAs with no GO
 280 annotation or no pathway affiliation for the vast majority (Figure 1E), leading to less powerful
 281 functional annotation clustering (Supplementary Table 2). Five clusters with an enrichment
 282 score >1.3 were obtained (an enrichment score >1.3 was used for a cluster to be statistically
 283 significant, as recommended by Huang et al., (Huang et al., 2009a) but the number of genes in each
 284 cluster was small except for annotation cluster number 4. In this, an absence of TOPAZ1 appeared to
 285 affect the extracellular compartment. The others referred to the antioxidant molecular function and
 286 the biological detoxification process, suggesting stressful conditions.

287 At P18, corresponding to the first transitions from prophase to metaphase, and considering either all
 288 DEGs (2748 DEGs; 2404 DAVID IDs) or only down-regulated genes (2491 DEGs; 2164 DAVID
 289 IDs) in the P18 *Topaz1*^{-/-} versus WT testes, it was possible to identify five identical clusters with an
 290 enrichment score higher than 12 (Figure 1F, Supplementary Table 3). However, the enrichment
 291 scores were higher when only down-regulated genes were considered. These clusters include the
 292 following GO terms: (i) for cellular components: motile cilium, ciliary part, sperm flagellum,

293 axoneme, acrosomal vesicule; (ii) for biological processes: microtubule-based process,
294 spermatogenesis, germ cell development, spermatid differentiation (Supplementary Table 3).

295 Finally, using the InterPro database, four clusters with enrichment scores >1.3 were obtained based
296 on down-regulated genes (Supplementary Table 3) and with-up-regulated genes, an absence of
297 TOPAZ1 from mouse testes highlighted the biological pathway of the response to external stimulus
298 or the defense response in the testes. Once again, and as for P16, this suggested stressful conditions
299 in these *Topaz1*^{-/-} testes.

300 These results indicate that an absence of TOPAZ1 induced alterations to the murine transcriptome of
301 the mutant testis transcriptome as early as 16 days after birth. Two days later (P18), these effects
302 were amplified and predominantly involved a down-regulation of genes (91% of DEGs). The loss of
303 TOPAZ1 appeared to disrupt the regulation of genes involved in microtubule and/or cilium mobility,
304 spermatogenesis and first meiotic division during the prophase to metaphase transition. This was in
305 agreement with the *Topaz1*^{-/-} phenotype in testes.

306 **3.3 An absence of TOPAZ1 leads to drastic cytoplasmic defects before the first meiotic** 307 **division**

308 According to the preceding GO pathway analyses showing that a majority of deregulated proteins are
309 involved in microtubule cytoskeleton organization, microtubule-based movements and processes,
310 microtubule organizing centers, centrosomes and centrioles in P18 *Topaz1*^{-/-} testes (Supplementary
311 Table 3), we decided to better characterize the cytoplasmic components of germ cells in *Topaz1*^{-/-}
312 testes before the first meiotic division. As the meiotic spindle is a key component of these cells
313 before and during the metaphase stage, we studied it using α - and γ -tubulin immunofluorescence (IF)
314 staining for markers of microtubule spindle and centrosome, respectively (Figure 2). We observed
315 one monopolar spindle centered in the germ cells of the *Topaz1*^{-/-} testes. Moreover, centrosome
316 staining was diffuse and weak in these cells. This was also observed on entire seminiferous sections
317 (Supplementary Figure 2). The chromosomes were not aligned along a metaphase plate but adopted
318 an atypical rosette shape (Figure 2), reflecting a marked perturbation of the microtubule and
319 centrosome pathways in *Topaz1*-deficient spermatocytes that could lead to meiotic arrest.

320 **3.4 Selection of three deregulated lncRNA, all spermatocyte-specific**

321 The vast majority of deregulated lncRNAs in *Topaz1*^{-/-} testes has an unknown function. We decided
322 to study three of the 35 down-regulated lncRNAs that are shared at the P16 and P18 stages, namely
323 *4930463O16Rik* (ENSMUSG00000020033), *4921513H07Rik* (ENSMUSG00000107042) that is the
324 most down-regulated gene at P16 with a Log2FC of 11.85, and both already highlighted by the
325 previous microarray comparative analyses (Luangpraseuth-Prosper et al., 2015), and *Gm21269*
326 (ENSMUSG00000108448), which has the lowest adjusted p-value at P18. We quantified these
327 transcripts by qPCR in several somatic tissues (brain, heart, liver, lung, small intestine, muscle,
328 spleen, kidney, epididymis and placenta) and in the gonads (testes and ovary). These three lncRNAs
329 were almost exclusively expressed in testes (Figure 3A, C, E). These results were in agreement with
330 RNA-seq data available for *4930463O16Rik* and *Gm21269* on the ReprOGenomics viewer
331 (<https://rgv.genouest.org/>) (Supplementary Figures 3A and 4A, respectively) (Darde et al., 2015,
332 2019). Our RNA-seq results, summarized using our read density data (bigwig) and the Integrative
333 Genomics Viewer (IGV; <http://software.broadinstitute.org/software/igv/>), revealed little or no
334 expression of these three genes in *Topaz1*^{-/-} testes (Supplementary Figure 5A-C).

335 Quantification of these transcripts using qPCR from postnatal to adulthood in WT and *Topaz1*^{-/-}
 336 testes had previously been reported, as for *4930463O16Rik* and *4921513H07Rik* (Figure 9 in
 337 (Luangpraseuth-Prosper et al., 2015)) or performed for *Gm21269* (Supplementary Figure 6, also
 338 including the postnatal expression of *4930463O16Rik* and *4921513H07Rik*). The difference in
 339 expression between normal and *Topaz1*^{-/-} testes was detected as being significant as early as P15
 340 (detected as insignificant in the previous microarray analysis and *Gm21269* was absent from the
 341 microarray employed). All showed an absence of expression, or at least an important down-
 342 regulation, in mutant testes.

343 To determine the testicular localization of these lncRNA, *in situ* hybridization (*ISH*) on adult WT
 344 testes sections was performed (Supplementary Figure 7) and the results summarized (Figure 3B, D,
 345 F). These lncRNAs were expressed in spermatocytes and the most intense probe labeling was
 346 observed at the pachytene stage. These results were confirmed by data on the ReproGenomics viewer
 347 for *4930463O16Rik* and *Gm21269* (<https://rgv.genouest.org/>) (Supplementary Figures 3B and 4B)
 348 (Darde et al., 2015, 2019).

349 To refine the subcellular localization of these transcripts in adult mouse testes, we paired *ISH*
 350 experiments and the IF staining of DDX4 protein (or Mvh, Mouse Vasa homolog). DDX4 is a germ
 351 cell cytoplasmic marker of germ cells, especially in the testes (Toyooka et al., 2000). Our results
 352 showed that the three lncRNAs observed displayed different intensities of expression depending on
 353 seminiferous epithelium stages. *4930463O16Rik* was expressed in the nucleus of spermatocytes with
 354 diffuse fluorescence, surrounded by cytoplasmic DDX4 labelling from the zygotene to the diplotene
 355 stages (Figure 4A-B-C). At the same spermatocyte stages (zygotene to diplotene), a diffuse labelling
 356 of *Gm21269*, similar to that of *4930463O16Rik*, was observed but with the addition of dot-shaped
 357 labelling that co-localized with DDX4 fluorescence (Figure 4D, E, F). *Gm21269* was therefore
 358 localized in the cytoplasm and nuclei of spermatocytes during meiosis. *4921513H07Rik* appeared to
 359 be cytoplasmic, with fluorescent red dots (*ISH*) surrounding the nuclei, and located in close
 360 proximity to DDX4 (IF) labelling (Figure 4G, H, I). At other stages, identified by DDX4 staining,
 361 *ISH* labelling of these three lncRNA revealed single dots in a few spermatogonia and in round
 362 spermatids. The same experiment was then repeated: *ISH* was followed by IF staining of γ H2Ax to
 363 highlight the sex body in spermatocytes (Supplementary Figure 8). No co-localization between the
 364 sex body and the three lncRNA was revealed.

365 Taken together, these results indicate that these spermatocyte-specific lncRNAs had different
 366 subcellular localizations in spermatocytes, suggesting functions in these male germ cells.

367 **3.5 Generation of 4930463O16Rik-deleted mice**

368 In order to evaluate a potential role in spermatogenesis for one of these lncRNAs, *4930463O16Rik*
 369 (the nuclear expressed gene), it was decided to suppress its expression in a mouse knockout model.

370 The *4930463O16Rik* gene (Chr10: 84,488,293-84,497,435 - GRCm38:CM001003.2) is described in
 371 public databases as consisting of four exons spanning approximately 10 kb in an intergenic locus on
 372 mouse chromosome 10. Using PCR and sequencing, we confirmed this arrangement (data not
 373 shown). In order to understand the role of *4930463O16Rik*, a new mouse line depleted of this
 374 lncRNA was created using CRISPR/Cas9 technology (Figure 5A). Briefly, multiple single guide
 375 RNAs (sgRNAs) were chosen, two sgRNAs in 5' of exon 1 and two sgRNAs in 3' of exon 4, so as to
 376 target the entire length of this gene (Figure 5A, C) and enhance the efficiency of gene deletion in the
 377 mouse (Han et al., 2014). Mice experiencing disruption of the target site were identified after the
 378 Sanger sequencing of PCR amplification of the genomic region surrounding the deleted locus (Figure

379 5D). *4930463O16Rik*^{+/-} mice were fertile and grew normally. Male and female *4930463O16Rik*^{+/-}
 380 animals were mated to obtain *4930463O16Rik*^{-/-} mice. Once the mouse line had been established, all
 381 pups were genotyped with a combination of primers (listed in Supplementary Table 4) (Figure 5B).

382 **3.6 The absence of 4930463O16Rik does not affect mouse fertility**

383 Fertility was then investigated in *4930463O16Rik*-deficient mice. Eight-week-old male and female
 384 *4930463O16Rik*^{-/-} mice were mated, and both sexes were fertile. Their litter sizes (7.5 ± 2.10 pups
 385 per litter, n=28) were similar to those of their WT counterparts (6.9 ± 2.12 pups per litter, n=20).
 386 There were no significant differences in terms of testicular size, testis morphology and histology and
 387 cauda and caput epididymis between WT and *4930463O16Rik*^{-/-} adult mice (Figure 6A, B). In
 388 addition, the different stages of seminiferous tubules divided into seven groups were quantified
 389 between *4930463O16Rik*^{-/-} and WT adult mice. No significant differences were observed between the
 390 two genotypes (Figure 6C). These results therefore demonstrated that *4930463O16Rik* is not required
 391 for mouse fertility.

392 **3.7 4930463O16Rik^{-/-} mice display modified sperm parameters**

393 The sperm parameters of 8-week-old *4930463O16Rik*-deficient testes were compared to WT testes of
 394 the same age. Sperm concentrations obtained from the epididymis of *4930463O16Rik*^{-/-} mice were
 395 significantly reduced by 57.2% compared to WT (Figure 7A) despite an unmodified testis/body
 396 weight ratio (Figure 6A). Motility parameters such as the percentage of motile spermatozoa, the
 397 motile mean expressed as beat cross frequency (bcf) and progressive spermatozoa were significantly
 398 higher in *4930463O16Rik*^{-/-} mice compared to WT (Figure 7B, C, D). From a morphological point of
 399 view, however, two parameters were significantly modified in the testes of mutant mice: the distal
 400 mid-piece reflex (DMR), a defect developing in the epididymis and indicative of a sperm tail
 401 abnormality (Johnson, 1997) and the percentage of spermatozoa with coiled tail (Figure 7E, F). In
 402 addition, two kinetic parameters were also significantly reduced in mutant sperm: the motile mean
 403 vsl, related to the progressive velocity in a straight line and the average path velocity, or vap (Figure
 404 7G, H).

405 These results obtained using computer-aided sperm analysis (CASA) thus showed that several sperm
 406 parameters; namely concentration, motility, morphology and kinetics were impacted in
 407 *4930463O16Rik* lncRNA-deficient mice. Some of them might negatively impact fertility, such as the
 408 sperm concentration, the DMR, the percentage of coiled tail and the motile mean vsl, while others
 409 would tend to suggest increased fertility, such as the motile mean percentage and bcf, and the
 410 progressive spermatozoa. These observations might have explained the normal fertility of
 411 *4930463O16Rik* lncRNA-deficient mice.

412 **3.8 Normal male fertility despite a modified transcriptome in 4930463O16Rik^{-/-} mouse testes**

413 Transcriptomic RNA-seq analyses were performed in WT and *4930463O16Rik*^{-/-} mouse testes at two
 414 developmental stages; i.e. at P16 and 18, as in the *Topaz1*^{-/-} mouse line.

415 At P16, seven genes were differentially expressed (adjusted p-value<0.05; absolute Log2FC>1),
 416 including *4930463O16Rik*, *1700092E16Rik* and *E230014E18Rik* (Supplementary Table 5). These
 417 latter two Riken cDNAs are in fact situated within the 3' transcribed RNA of *4930463O16Rik*
 418 (positioned in Figure 5C) and correspond to a unique locus. The transcriptional activity of this new
 419 locus stops towards the 3' end of the *cKap4* gene (cytoskeleton-associated protein 4 or Climp-63).

420 This gene was down-regulated 1.7-fold in both knock-out lines (*Topaz1* and *4930463O16Rik*), which
421 could suggest a newly discovered positive regulatory role for this lncRNA on the *cKap4* gene.

422 At P18, 258 genes were differentially expressed (199 down-regulated and 59 up-regulated using the
423 same statistical parameters; Supplementary Table 5). Among them, 206 were protein-coding genes
424 accounting for 79.8% of DEGs (Figure 8A). Thus, P18 DEGs highlighted a direct or indirect
425 relationship between the loss of the *4930463O16Rik* lncRNA and protein-coding genes. In addition,
426 loss of this lncRNA also resulted in the deregulation of 37 (14.3%) other lncRNAs.

427 The validation of several DEGs was performed by RT-qPCR using WT and *4930463O16Rik*^{-/-}
428 testicular RNAs at both developmental stages (P16 and P18) (Supplementary Figure 9). The qPCR
429 results for the genes thus tested were consistent with those of RNA-seq.

430 The *4930463O16Rik*^{-/-} DEGs were also analyzed using the DAVID database (Supplementary Table
431 6). At P18, six functional clusters had an enrichment score >1.3 (Huang et al., 2009a). As for *Topaz1*^{-/-}
432 mouse testes, they included the following GO terms: (i) for cellular components: cilium movement,
433 ciliary part, axoneme, and (ii) for biological processes: microtubule-based process, regulation of
434 cilium movement, spermatogenesis, male gamete generation, spermatid development and
435 differentiation (Supplementary Table 6). An analysis that discriminated up-regulated from down-
436 regulated genes only increased the value of the enrichment scores for the latter. The absence of
437 TOPAZ1 protein or of *4930463O16Rik* lncRNA caused the same enrichment clusters in mutant testes
438 despite different outcomes regarding the fertility of male mice. The other clusters from the DAVID
439 analysis referred to the GO terms: cell surface, external side of membrane, defense or immune
440 response and response to external stimulus. These clusters were only found in the DAVID analysis
441 with up-regulated genes.

442 Therefore, the *4930463O16Rik* gene would appear to regulate genes related to spermatogenesis,
443 microtubule or ciliary organization and the cytoskeleton in P18 testes. In the absence of this lncRNA,
444 some genes involved in defense mechanisms or the immune response are also deregulated,
445 suggesting stressful conditions. It should be noted that the majority (228/258 or 88%) of the DEGs
446 from P18-*4930463O16Rik*^{-/-} testes was in common with those deregulated in *Topaz1*^{-/-} mice (Figure
447 8B). This led to similar results following ontological analyses of the DEGs of the two mutant lines.
448 In the *Topaz1*^{-/-} testes, these 228 genes could be a consequence of the down-regulation of
449 *4930463O16Rik* lncRNA. On the other hand, these 228 DEGs alone do not explain meiotic arrest in
450 the *Topaz1*^{-/-} testes.

451

452 4 Discussion

453 *Topaz1* was initially reported as a germ-cell specific factor (Baillet et al., 2011) essential for meiotic
454 progression and male fertility in mice (Luangpraseuth-Prosper et al., 2015). The suppression of
455 *Topaz1* led to an arrest of meiosis progression at the diplotene-metaphase I transition associated with
456 germ cell apoptosis. Moreover, an initial transcriptomic approach, based on DNA microarrays,
457 enabled the observation of a large but not exhaustive repertoire of deregulated transcripts. Using this
458 technology, 10% of differentially-expressed probes were lncRNAs and presented deregulated
459 expression in P20 *Topaz1*^{-/-} testes compared to WT.

460 During this study, we were able to show that the effects of the *Topaz1* gene being absent were visible
461 on the mouse testicular transcriptome as early as 16 days *post-partum*, i.e. before the first meiotic

462 division and the production of haploid germ cells. These effects were amplified at 18 days *post-*
 463 *partum*, just before or at the very start of the first haploid germ cells appearing. The molecular
 464 pathways involved in the suppression of TOPAZ1 form part of spermatogenesis and the
 465 establishment of the cell cytoskeleton. At these two stages, P16 and P18, about a quarter of the
 466 deregulated genes in testes were ncRNAs (mainly lncRNAs) some of which displayed almost no
 467 expression in *Topaz1*^{-/-} testes. Suppressing one of them did not prevent the production of haploid
 468 spermatids and spermatozoa, but halved the murine sperm concentration. Furthermore, by deleting
 469 ~10 kb corresponding to this *4930463O16Rik* lincRNA, we showed that the transcriptional extinction
 470 was even longer, encompassing ~35 kb in total and two other genes (1700092E16Rik (unknown gene
 471 type according to Ensembl) and the lincRNA E230014E18Rik). Indeed, our transcriptional data
 472 suggested that these three annotated loci belong to a unique gene. Transcription of this lincRNA
 473 ended near the 3' region of the *cKap4* gene, known to be associated with the cytoskeleton (Vedrenne
 474 and Hauri, 2006). Remarkably, cKap4 expression was down-regulated 1.7 fold in both types of
 475 knockout mouse (*Topaz1*^{-/-} and *4930463O16Rik*^{-/-}), suggesting a previously unknown and positive
 476 regulatory role of *4930463O16Rik* on *cKap4*.

477 4.1 Topaz1 ablation leads to chromosome misalignments at pro-metaphase I

478 Meiosis and its two cell divisions are well-orchestrated sequences of events controlled by different
 479 genes. Although these divisions have many similarities between males and females, meiosis is also
 480 sex-dimorphic. This particularly concerns timing, synchronization, the number of haploid gametes
 481 produced and the periods of meiotic arrest (reviewed by (Handel and Eppig, 1998)). In females,
 482 meiosis is initiated during fetal life and oocyte development is arrested at the end of prophase I; they
 483 remain in this arrested state until the onset of ovulatory cycles around puberty. The first division of
 484 meiosis then resumes and leads to the release of a first polar globule with the secondary oocyte. At
 485 metaphase II, the oocyte is blocked again. Release of the second polar globule leading to the
 486 formation of the female gamete only occurs at fertilization (Handel and Eppig, 1998). In males,
 487 meiosis is a continuous process during the post-natal period, just before puberty, and results in the
 488 formation of four male gametes from one spermatocyte. Despite these sex-dimorphic differences, the
 489 first reductional division of meiosis is highly conserved between species and between sexes in terms
 490 of morphology and genetic regulation. It has been hypothesized that the mechanisms regulating and
 491 controlling prophase I during mammalian meiosis, frequently named "checkpoints", are more
 492 stringent in males than in females. This has been demonstrated during the past 25 years by the use of
 493 a large number of mutant mouse models, mainly gene knockout mice (Morelli and Cohen, 2005;
 494 Handel and Schimenti, 2010; Su et al., 2011).

495 A major checkpoint in males is the synaptic checkpoint that controls zygotene-pachytene transition,
 496 highlighted in male mice lacking *Sycp3*, *Dmcl1*, *Spo11*, *mei1*, *Msh4-5* or *OvoL1* genes (Pittman et al.,
 497 1998; Edelmann et al., 1999; Baudat et al., 2000; Kneitz et al., 2000; Romanienko and Camerini-
 498 Otero, 2000; Yuan et al., 2000; Li et al., 2005; Reinholdt and Schimenti, 2005). In mutant females,
 499 this synaptic checkpoint is less stringent. Indeed, female meiotic arrest may occur later, starting from
 500 the diplotene, as seen in *Dmcl1*, *mei1*, *Msh4-5* knockout mice during the dictyate-resting phase of the
 501 oocyte, evidenced in *Spo11*. These female mice may even be fertile, as seen in *OvoL1* knockout
 502 mouse (Li et al., 2005). Other gene suppressions have highlighted a second meiotic checkpoint of
 503 metaphase I in males (such as those of *Mlh1-3*, or cyclin A1) due to a misalignment of chromosomes
 504 on the spindle (Liu et al., 1998; Eaker et al., 2002; Lipkin et al., 2002). Male mice devoid of the
 505 *Topaz1* gene may match these latter models. Indeed, *Topaz1*^{-/-} spermatocytes do not progress to
 506 metaphase I and the chromosomes are not properly aligned on the metaphase plate. *Topaz1*^{-/-} females
 507 are however fertile.

508 **4.2 TOPAZ1 seems to be involved in the shape, structure and movements of cells**

509 Absence of the *Topaz1* gene disturbs the transcriptome of murine testes as early as 16 days postnatal.
 510 Of the 205 DEGs at P16, 85 were specific to this stage of development compared to P18 (Figure 1A),
 511 such as *Ptgs1* (*Cox1*) a marker of peritubular cells (Rey-Ares et al., 2018), and *Krt18* a marker of
 512 Sertoli cell maturation (Tarulli et al., 2006). Moreover, different genes involved in the TGF β pathway
 513 were also P16-DEGs, such as *Bmpr1b*, *Amh* and *Fstl3*. The latter, for example, was demonstrated to
 514 reduce the number of Sertoli cells in mouse testes and to limit their size (Oldknow et al., 2013).
 515 *Ptgds* (*L-Pgds*), which plays a role in the PGD2 molecular pathway during mammalian testicular
 516 organogenesis, is also deregulated (Moniot et al., 2009). All these genes, specifically deregulated at
 517 P16 due to the absence of *Topaz1*, thus appeared to participate in regulating cell communication. At
 518 P18, these genes were no longer differential but they could be replaced by genes belonging to the
 519 same gene families, such as the cadherin or keratin families.

520 Many of the 205 DEGs at P16 were involved in defense response pathways. For example, *Ifit3* and
 521 *Gbp3* are immune response genes in spermatocyte-derived GC-2spd(ts) cells (Kurihara et al., 2017).

522 Two days later, at P18, just before the prophase I-metaphase 1 transition, ten times more genes were
 523 deregulated. Among the 120 DEGs common to P16 and P18, there was at least one gene that might
 524 be involved in meiosis such as *Aym1*, an activator of yeast meiotic promoters 1. The absence of
 525 *Topaz1* led to a lack of the testicular expression of *Aym1*. This gene is germ cell-specific (Malcov et
 526 al., 2004). In male mice, *Aym1* is expressed from 10 dpp in early meiotic spermatocytes. The small
 527 murine AYM1 protein (44 amino acids) is immunolocalized in the nucleus of primary spermatocytes,
 528 mainly late pachytene and diplotene, suggesting a nuclear role for AYM1 in germ cells during the
 529 first meiotic division (Malcov et al., 2004).

530 At P18, the testicular transcriptome of *Topaz1*^{-/-} mice was largely disturbed when compared to WT
 531 animals, and most DEGs were down-regulated (Figure 1F), suggesting that TOPAZ1 promotes gene
 532 expression in normal mice. As TOPAZ1 is predicted to be an RNA-binding protein, it is tempting to
 533 speculate that its absence disorganized ribonucleic-protein complexes, including their instabilities
 534 and degradation. This could partly explain why 90% of DEGs were down-regulated at P18 and
 535 included a large proportion of lincRNAs. These down-regulated genes at P18 concerned microtubule-
 536 based movement and microtubule-based processes, and cellular components relative to motile cilium,
 537 ciliary part, sperm flagellum and axoneme. In addition, DAVID analysis revealed GO terms such as
 538 centriole, microtubule and spermatogenesis. All these terms relate to elements of the cytoskeleton
 539 that are indispensable for mitotic and/or meiotic divisions, motility and differentiation and are also
 540 widely involved in spermiogenesis, as might be expected with this latter GO term because most
 541 DEGS are testis-specific. The centriole is a widely conserved organelle in most organisms. A pair of
 542 centrioles is located at the heart of the centrosome, and the whole is grouped together as the main
 543 microtubule-organizing center (MTOC). During our study, staining of the meiotic spindle and
 544 centrosomes revealed a disturbance of these pathways (Figure 2 and Supplementary Figure 2). Such
 545 abnormal metaphase-like chromosomes were arranged in rosettes rather than being neatly aligned at
 546 the cell equator, and hemispindles centered in the spermatocytes had previously been observed. For
 547 example, aberrant prometaphase-like cells were observed in *Mlh1*- or *Meioc*-deficient testes (*Meioc*
 548 is down-regulated 1.51-fold in P18 in *Topaz1*^{-/-} testes) (Eaker et al., 2002; Abby et al., 2016). These
 549 mutant mice have been described as displaying an arrest of male meiosis, and testes devoid of
 550 haploid germ cells leading to male sterility like mice lacking the *Topaz1* gene. In *Topaz1*^{-/-} testes,
 551 *Mlh1* is not a DEG.

552 During spermatogenesis, the dysregulation of centrosome proteins may affect meiotic division and
 553 genome stability. The centriole proteins CEP126, CEP128, CEP63 were down-regulated (FC from
 554 2.1 to 2.7 compared to WT) at P18 in *Topaz1*^{-/-} testes. CEP126 is localized with γ -tubulin on the
 555 centriole during the mitosis of hTERT-RPE-1 (human telomerase-immortalized retinal pigmented
 556 epithelial cells) (Bonavita et al., 2014) but has never been studied in germ cells during meiosis.
 557 CEP128 was localized to the mother centriole and required to regulate ciliary signaling in zebrafish
 558 (Mönnich et al., 2018). *Cep128* deletion decreased the stability of centriolar microtubules in F9 cells
 559 (epithelial cells from testicular teratoma of mouse embryo) (Kashihara et al., 2019). Centriole
 560 separation normally occurs at the end of prophase I or in early metaphase I, and CEP63 is associated
 561 with the mother centrioles. The mouse model devoid of *Cep63* leads to male infertility (Marjanović
 562 et al., 2015), and in spermatocytes from these mice, the centriole duplication was impaired. Finally,
 563 our ontology analysis of *Topaz1*^{-/-} P18-DEGs revealed significant enrichment scores for the several
 564 clusters relative to the final structure of spermatozoa such as tetratricopeptide repeat (TPR) and
 565 dynein heavy chain (DNAH1) clusters. Dynein chains are macromolecular complexes connecting
 566 central or doublet pairs of microtubules together to form the flagellar axoneme, the motility apparatus
 567 of spermatozoa (ref in (Miyata et al., 2020a)). Dynein proteins have also been identified as being
 568 involved in the microtubule-based intracellular transport of vesicles, and in both mitosis and meiosis
 569 (Mountain and Compton, 2000).

570 The TPR or PPR (pentatricopeptide repeat) domains consist of several 34 or 36 amino acid repeats
 571 that make up α -hairpin repeat units, respectively (D'Andrea and Regan, 2003). The functions of
 572 TPR or PPR proteins were firstly documented in plants and are involved in RNA editing (D'Andrea
 573 and Regan, 2003; Schmitz-Linneweber and Small, 2008). In the mouse, *Cfap70*, a tetratricopeptide
 574 repeat-containing gene, was shown to be expressed in the testes (Shamoto et al., 2018), or as *Spag1*
 575 in late-pachytene spermatocytes or round spermatids (Takaishi and Huh, 1999). Moreover, *Ttc21a*
 576 knockout mice have displayed sperm structural defects of the flagella and the connecting piece. In
 577 humans, *Ttc21a* has been associated with asthenoteratospermia in the Chinese population (Liu et al.,
 578 2019). Numerous components of the intraflagellar transport (IFT) complex contain TPR. Several
 579 genes coding for such tetratricopeptide repeat-containing proteins are down-regulated in P18 testes
 580 devoid of *Topaz1*, such as *Cfap70*, *Spag1*, *Tct21a* and *Ift140*. Based on TPRpred (Karpenahalli et al.,
 581 2007) that predicted TPR- or PPR-containing proteins, the TOPAZ1 protein was predicted to contain
 582 such domains; seven in mice (p-val= 7.5E-08, probability of being PPR= 46.80%) and ten in humans
 583 (p-val= 3.4E-09, probability of being PPR = 88.76%).

584 A recent study of single cell-RNA-seq from all types of homogeneous spermatogenic cells
 585 identified clusters of cells at similar developmental stages (Chen et al., 2018a). This study shown that
 586 most of the genes involved in spermiogenesis start being expressed from the early pachytene stage.
 587 This is consistent with our RNA-seq results. Taken together, these data indicate that the absence of
 588 *Topaz1* down-regulated a significant number of cytoskeleton-related genes, leading to a defect in
 589 formation of the meiotic spindle and to a deficient duplication and/or migration of centrosomes as
 590 early as 18 days post-natal. *Topaz1* could lead to impaired chromosome dynamics via the activation
 591 of cytoskeleton genes, thus revealing the essential role of the centrosome in promoting division and
 592 then fertility. TOPAZ1 may act via its TPR domains.

593 4.3 Topaz1 ablation deregulates a high proportion of lncRNAs

594 DEGs between *Topaz1*^{-/-} and WT mouse testes also revealed a high proportion of deregulated
 595 lncRNAs. We showed that three lncRNAs, whose expression was almost abolished as early as P16
 596 in *Topaz1*-deficient mouse testes, were testis- and germ cell-specific. We showed that these genes are

597 expressed in spermatocytes and round spermatids, suggesting a role in spermatogenesis. Their
598 functions are still unknown.

599 Several investigations have revealed that the testis allow the expression of many lncRNAs (Necsulea
600 et al., 2014). In mammals, the testis is the organ with the highest transcription rate (Soumillon et al.,
601 2013). However, during the long stage of prophase I, these levels of transcription are not consistent.
602 Indeed, transcription is markedly reduced or even abolished in the entire nucleus of spermatocytes
603 during the early stages of prophase I. This is accompanied in particular by the nuclear processes of
604 DNA division, the pairing of homologous chromosomes and telomeric rearrangements (Bolcun-Filas
605 and Schimenti, 2012; Baudat et al., 2013; Shibuya and Watanabe, 2014), and also by the appearance
606 of MSC1 (meiotic sex chromosome inactivation) markers (Page et al., 2012). These processes are
607 supported by epigenetic changes such as histone modifications and the recruitment of specific histone
608 variants (references in Page et al., 2012). Transcription then takes up an important role in late-
609 pachytene to diplotene spermatocytes (Monesi, 1964). The aforementioned scRNA-seq study of
610 individual spermatogenic cells showed that almost 80% of annotated autosomal lncRNAs were
611 expressed in spermatogenic cells, mainly in mid-pachytene- to metaphase I-spermatocytes but also
612 in round spermatids (Chen et al., 2018a). The three lncRNAs investigated during our study
613 (*4930463O16Rik*, *Gm21269* and *4921513H07Rik*) were also expressed at these developmental stages
614 in mouse testes (Chen et al., 2018b; Li et al., 2021). In the latter study (Li et al., 2021), the authors
615 identified certain male germline-associated lncRNAs as being potentially important to
616 spermatogenesis *in vivo*, based on several computational and experimental data sets; these lncRNAs
617 included *Gm21269* and *4921513H07Rik*. The localization of lncRNAs in cells may be indicative of
618 their potential function (Chen, 2016). *4930463O16Rik* is expressed in the nucleus of spermatocytes.
619 As mentioned above, *4930463O16Rik* may play a positive role in the expression of *cKap4* at the
620 neighboring locus. Some nuclear lncRNA are involved in regulating transcription with a *cis*-
621 regulatory role, such as *Malat1* or *Air* (Sleutels et al., 2002; Zhang et al., 2012) on a nearby gene.
622 Other nuclear lncRNAs act in *trans* and regulate gene transcription at another locus, such as *HOTAIR*
623 (Chu et al., 2011). In addition, some cytoplasmic lncRNA have been shown to play a role in miRNA
624 competition, acting as miRNA sponges or decoys (such as *linc-MD1* in human myoblasts (Cesana et
625 al., 2011)). *Gm21269* is localized in the cytoplasm and nuclei of spermatocytes during meiosis. Both
626 cytoplasmic and nuclear lncRNAs may act as a molecular scaffold for the assembly of functional
627 protein complexes, such as *HOTAIR* or *Dali* (Tsai et al., 2010; Chalei et al., 2014), regulating protein
628 localization and/or direct protein degradation, or acting as an miRNA precursor (Cai and Cullen,
629 2007). Finally, multiple other roles can be observed for lncRNAs. For example, the *Dali* lincRNA
630 locally regulates its neighboring *Pou3f3* gene, acts as a molecular scaffold for POU3F3 protein and
631 interacts with DNMT1 in regulating the DNA methylation status of CpG island-associated promoters
632 in *trans* during neural differentiation (Chalei et al., 2014).

633 4.4 The deletion of one lncRNA alters sperm parameters without affecting fertility

634 To decipher the biological function of an lncRNA affected by *Topaz1* invalidation, a mouse model
635 devoid of *4930463O16Rik* was produced, with the same genetic background as *Topaz1*^{-/-} mice. This
636 knockout mouse model did not exhibit meiosis disruption and the fertility of these mutant mice
637 remained intact under standard laboratory conditions. Using a similar approach, *Sox30* is a testis-
638 specific factor that is essential to obtain haploid germ cells during spermatogenesis (Bai et al., 2018).
639 SOX30 regulates *Dnajb8* expression, but the deletion of *Dnajb8* is not essential for spermatogenesis
640 and male fertility (Wang et al., 2020).

641 Several mutant mice deprived of testis-specific genes proved to be fertile, although no role has been
 642 established for these genes during spermatogenesis. This was noted in particular for the *Flacc1*,
 643 *Trim69*, *Tex55*, *4930524B15Rik* genes (Chotiner et al., 2020; He et al., 2020; Khan et al., 2020;
 644 Jamin et al., 2021) or for highly testis-enriched genes such as *Kdm4d*, *Tex37*, *Ccdc73* or *Prss55*
 645 (Iwamori et al., 2011; Khan et al., 2018). Some of them were down-regulated genes in *Topaz1*^{-/-} or
 646 *4930463O16Rik*^{-/-} testes (*Trim69* in *Topaz1*^{-/-} FC = 3.99 and in *4930463O16Rik*^{-/-} FC = 2.27; *Kdm4d*
 647 in *Topaz1*^{-/-} FC = 2.70 and in *4930463O16Rik*^{-/-} FC = 1.83; *Ccdc73* in *Topaz1*^{-/-} FC = 1.46). Some
 648 laboratories have recently also generated several dozen testis-enriched knockout mouse lines using
 649 the CRISPR/Cas9 system and shown that all these genes are individually dispensable in terms of
 650 male fertility in mice (Miyata et al., 2016; Lu et al., 2019).

651 The abundant expression of lncRNAs during spermatogenesis has also prompted other laboratories to
 652 produce knockout mouse models of testis-specific lncRNAs. This was the case for *1700121C10Rik*
 653 or *lncRNA5512* lncRNAs where mutant mice were also fertile without variations in their sperm
 654 parameters (Li et al., 2020; Zhu et al., 2020). One working hypothesis might be that some lncRNAs
 655 may regulate subsets of functional spermatogenic-gene expression, in line with their nuclear
 656 localization, by binding to their regulatory genomic region.

657 Nevertheless, in our *4930463O16Rik*-knockout mouse model, several sperm parameters were altered,
 658 including reduction in epididymal sperm concentrations (by more than half) and sperm motility. In
 659 *Tslrn1* knockout mice (testis-specific long non-coding RNA 1) the males were fertile and displayed
 660 significantly lower sperm levels (-20%) but no reduction in litter size, or major defects in testis
 661 histology or variations in sperm motility (Wichman et al., 2017). In *Kif9*-mutant male mice, no testes
 662 abnormalities were found (Miyata et al., 2020b). They were sub-fertile due to impaired sperm
 663 motility: the VSL and VAP velocity parameters were reduced, as in *4930463O16Rik* knockout mice.
 664 The authors concluded that *Kif9* mutant mice were still fertile and this was probably due to variations
 665 in the motility of individual spermatozoa; those with good motility could still fertilize oocytes. The
 666 same conclusion may apply to *4930463O16Rik*^{-/-} mice.

667 The suppression of a gene – in this case *4930463O16Rik* lincRNA – whose expression is markedly
 668 down-regulated in the testes of sterile *Topaz1*^{-/-} mice (FC = 40), has no effect on spermatogenesis.
 669 Our data suggest that the expression of *4930463O16Rik* is not essential for meiotic division but adds
 670 to the terminal differentiation of male germ cells.

671 Various genes, either testis-specific or highly expressed in the testes, exert no effect on reproduction
 672 when deleted independently (Miyata et al., 2016; Li et al., 2020). Given the large number of
 673 lncRNAs expressed in meiotic testes, one explanation may be that the function of *4930463O16Rik* is
 674 partly redundant with that of other testicular lncRNAs. However, outside the laboratory, in wild
 675 reproductive life, one might imagine that biological functions may differ under more natural
 676 conditions due to stress and reproductive competition. This has been shown in particular for *Pkdrej*-
 677 deficient male mice which are fertile, whereas the *Pkdrej* gene (polycystin family receptor for egg
 678 jelly), is important to postcopulatory reproductive selection (Sutton et al., 2008; Miyata et al., 2016).

679 The absence of a specific anti-TOPAZ1 antibody did not enable us to further advance in our
 680 understanding of its function during murine spermatogenesis. The creation of a Flag-tagged *Topaz1*
 681 knockin mouse model will allow us to gain further insights, and Rip-seq experiments will enable the
 682 determination of RNA-TOPAZ1 complexes during spermatogenesis.

683 In summary, *Topaz1* is a gene that is essential for fertility in male mice. Its absence leads to meiotic
 684 arrest before the first division; germ cells display a centered monopolar spindle and a
 685 misarrangement of chromosomes. In addition, *Topaz1* stabilizes the expression of many lncRNAs.
 686 The suppression of one of them is not essential to mouse fertility but it is necessary during the
 687 terminal differentiation of male germ cells to achieve optimal function.

688 **5 Acknowledgments**

689 Our warmest thanks go to Jean-Luc Vilotte for allowing lncRNA deletion to take place in his
 690 laboratory, and also for proofreading this manuscript. We would like to thank the TACGENE facility
 691 at U1154-UMR7196, MNHN, Paris, and especially Anne De Cian and Jean-Paul Concordet, for the
 692 synthesis of gRNAs and Cas9 mRNA. We are grateful to all members of our mouse experimental
 693 unit (IERP, INRA, Jouy en Josas, France). We thank the @Bridge platform for use of the Agilent
 694 Bioanalyzer and for histology facilities (UMR 1313 GABI, Jouy-en-Josas, France), and particularly
 695 Marthe Vilotte for HE staining. We also thank the MIMA2 platform for providing access to the
 696 virtual slide scanner (Panoramic SCAN, 3DHISTECH). Finally, we are grateful to all members of the
 697 "Gonad Differentiation and its Disturbances" team for our scientific and technical discussions on
 698 Monday mornings, either in person or by videoconference. Vicky Hawken was responsible for the
 699 English language editing of this manuscript.

700 **6 Reference**

- 701 Abby, E., Tourpin, S., Ribeiro, J., Daniel, K., Messiaen, S., Moison, D., et al. (2016). Implementation
 702 of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of
 703 meiotic transcripts. *Nat Commun* 7, 10324. doi:10.1038/ncomms10324.
- 704 Anguera, M. C., Ma, W., Clift, D., Namekawa, S., Kelleher, R. J., and Lee, J. T. (2011). Tsx
 705 produces a long noncoding RNA and has general functions in the germline, stem cells, and
 706 brain. *PLoS Genet* 7, e1002248. doi:10.1371/journal.pgen.1002248.
- 707 Arun, G., Akhade, V. S., Donakonda, S., and Rao, M. R. S. (2012). mrhl RNA, a long noncoding
 708 RNA, negatively regulates Wnt signaling through its protein partner Ddx5/p68 in mouse
 709 spermatogonial cells. *Mol Cell Biol* 32, 3140–3152. doi:10.1128/MCB.00006-12.
- 710 Bai, S., Fu, K., Yin, H., Cui, Y., Yue, Q., Li, W., et al. (2018). Sox30 initiates transcription of
 711 haploid genes during late meiosis and spermiogenesis in mouse testes. *Development* 145.
 712 doi:10.1242/dev.164855.
- 713 Baillet, A., Le Bouffant, R., Volff, J. N., Luangpraseuth, A., Poumerol, E., Thépot, D., et al. (2011).
 714 TOPAZ1, a novel germ cell-specific expressed gene conserved during evolution across
 715 vertebrates. *PLoS One* 6, e26950. doi:10.1371/journal.pone.0026950.
- 716 Baudat, F., Imai, Y., and de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and
 717 regulation. *Nat Rev Genet* 14, 794–806. doi:10.1038/nrg3573.
- 718 Baudat, F., Manova, K., Yuen, J. P., Jasin, M., and Keeney, S. (2000). Chromosome synapsis defects
 719 and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6, 989–998.
 720 doi:10.1016/s1097-2765(00)00098-8.

- 721 Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and
722 Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*
723 *(Methodological)* 57, 289–300.
- 724 Bie, B., Wang, Y., Li, L., Fang, H., Liu, L., and Sun, J. (2018). Noncoding RNAs: Potential players
725 in the self-renewal of mammalian spermatogonial stem cells. *Mol Reprod Dev* 85, 720–728.
726 doi:10.1002/mrd.23041.
- 727 Bolcun-Filas, E., and Schimenti, J. C. (2012). Genetics of meiosis and recombination in mice. *Int Rev*
728 *Cell Mol Biol* 298, 179–227. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00005-5.
- 729 Bonavita, R., Walas, D., Brown, A. K., Luini, A., Stephens, D. J., and Colanzi, A. (2014). Cep126 is
730 required for pericentriolar satellite localisation to the centrosome and for primary cilium
731 formation. *Biol Cell* 106, 254–267. doi:10.1111/boc.201300087.
- 732 Brannan, C. I., Dees, E. C., Ingram, R. S., and Tilghman, S. M. (1990). The product of the H19 gene
733 may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 10, 28–36. doi:10.1128/mcb.10.1.28.
- 734 Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G. F., McCabe, V. M., Norris, D. P., Cooper, P. J., et al. (1992).
735 The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no
736 conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* 71, 515–526. doi:10.1016/0092-
737 8674(92)90519-i.
- 738 Cai, X., and Cullen, B. R. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA
739 precursor. *RNA* 13, 313–316. doi:10.1261/rna.351707.
- 740 Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., et al. (2005). The
741 transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559–1563.
742 doi:10.1126/science.1112014.
- 743 Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., et al. (2011). A
744 long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing
745 endogenous RNA. *Cell* 147, 358–369. doi:10.1016/j.cell.2011.09.028.
- 746 Chalei, V., Sansom, S. N., Kong, L., Lee, S., Montiel, J. F., Vance, K. W., et al. (2014). The long
747 non-coding RNA Dali is an epigenetic regulator of neural differentiation. *Elife* 3, e04530.
748 doi:10.7554/eLife.04530.
- 749 Chen, L.-L. (2016). Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. *Trends Biochem Sci*
750 41, 761–772. doi:10.1016/j.tibs.2016.07.003.
- 751 Chen, Y., Zheng, Y., Gao, Y., Lin, Z., Yang, S., Wang, T., et al. (2018a). Single-cell RNA-seq
752 uncovers dynamic processes and critical regulators in mouse spermatogenesis. *Cell Res* 28,
753 879–896. doi:10.1038/s41422-018-0074-y.
- 754 Chen, Y., Zheng, Y., Gao, Y., Lin, Z., Yang, S., Wang, T., et al. (2018b). Single-cell RNA-seq
755 uncovers dynamic processes and critical regulators in mouse spermatogenesis. *Cell Res* 28,
756 879–896. doi:10.1038/s41422-018-0074-y.

- 757 Chotiner, J. Y., Leu, N. A., and Wang, P. J. (2020). FLACC1 is testis-specific but dispensable for
758 fertility in mice. *Mol Reprod Dev* 87, 1199–1201. doi:10.1002/mrd.23435.
- 759 Chu, C., Qu, K., Zhong, F. L., Artandi, S. E., and Chang, H. Y. (2011). Genomic maps of long
760 noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol Cell* 44,
761 667–678. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.027.
- 762 D’Andrea, L. D., and Regan, L. (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28,
763 655–662. doi:10.1016/j.tibs.2003.10.007.
- 764 Darde, T. A., Lecluze, E., Lardenois, A., Stévant, I., Alary, N., Tüttelmann, F., et al. (2019). The
765 ReproGenomics Viewer: a multi-omics and cross-species resource compatible with single-
766 cell studies for the reproductive science community. *Bioinformatics* 35, 3133–3139.
767 doi:10.1093/bioinformatics/btz047.
- 768 Darde, T. A., Sallou, O., Becker, E., Evrard, B., Monjeaud, C., Le Bras, Y., et al. (2015). The
769 ReproGenomics Viewer: an integrative cross-species toolbox for the reproductive science
770 community. *Nucleic Acids Res* 43, W109-116. doi:10.1093/nar/gkv345.
- 771 Drumond, A. L., Meistrich, M. L., and Chiarini-Garcia, H. (2011). Spermatogonial morphology and
772 kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach.
773 *Reproduction* 142, 145–155. doi:10.1530/REP-10-0431.
- 774 Eaker, S., Cobb, J., Pyle, A., and Handel, M. A. (2002). Meiotic prophase abnormalities and
775 metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of
776 spermatogenic progress. *Dev Biol* 249, 85–95. doi:10.1006/dbio.2002.0708.
- 777 Edelmann, W., Cohen, P. E., Kneitz, B., Winand, N., Lia, M., Heyer, J., et al. (1999). Mammalian
778 MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat Genet* 21, 123–127.
779 doi:10.1038/5075.
- 780 ENCODE Project Consortium, Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R.,
781 Gingeras, T. R., et al. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the
782 human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799–816.
783 doi:10.1038/nature05874.
- 784 Gil, R., and Latorre, A. (2012). Factors behind junk DNA in bacteria. *Genes (Basel)* 3, 634–650.
785 doi:10.3390/genes3040634.
- 786 Han, J., Zhang, J., Chen, L., Shen, B., Zhou, J., Hu, B., et al. (2014). Efficient in vivo deletion of a
787 large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. *RNA Biol* 11, 829–835. doi:10.4161/rna.29624.
- 788 Handel, M. A., and Eppig, J. J. (1998). Sexual dimorphism in the regulation of mammalian meiosis.
789 *Curr Top Dev Biol* 37, 333–358. doi:10.1016/s0070-2153(08)60179-9.
- 790 Handel, M. A., and Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics
791 and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11, 124–136. doi:10.1038/nrg2723.

- 792 He, X., Xie, W., Li, H., Cui, Y., Wang, Y., Guo, X., et al. (2020). The testis-specifically expressed
793 gene Trim69 is not essential for fertility in mice. *J Biomed Res* 35, 47–60.
794 doi:10.7555/JBR.34.20200069.
- 795 Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative
796 quantification framework and software for management and automated analysis of real-time
797 quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- 798 Henao-Mejia, J., Williams, A., Rongvaux, A., Stein, J., Hughes, C., and Flavell, R. A. (2016).
799 Generation of Genetically Modified Mice Using the CRISPR-Cas9 Genome-Editing System.
800 *Cold Spring Harb Protoc* 2016, pdb.prot090704. doi:10.1101/pdb.prot090704.
- 801 Huang, D. W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009a). Systematic and integrative analysis of
802 large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44–57.
803 doi:10.1038/nprot.2008.211.
- 804 Huang, D. W., Sherman, B. T., Zheng, X., Yang, J., Imamichi, T., Stephens, R., et al. (2009b).
805 Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr Protoc Bioinformatics*
806 Chapter 13, Unit 13.11. doi:10.1002/0471250953.bi1311s27.
- 807 Iwamori, N., Zhao, M., Meistrich, M. L., and Matzuk, M. M. (2011). The testis-enriched histone
808 demethylase, KDM4D, regulates methylation of histone H3 lysine 9 during spermatogenesis
809 in the mouse but is dispensable for fertility. *Biol Reprod* 84, 1225–1234.
810 doi:10.1095/biolreprod.110.088955.
- 811 Jamin, S. P., Petit, F. G., Demini, L., and Primig, M. (2021). Tex55 encodes a conserved putative A-
812 kinase anchoring protein dispensable for male fertility in the mouse. *Biol Reprod*.
813 doi:10.1093/biolre/ioab007.
- 814 Jarroux, J., Morillon, A., and Pinskaya, M. (2017). History, Discovery, and Classification of
815 lncRNAs. *Adv Exp Med Biol* 1008, 1–46. doi:10.1007/978-981-10-5203-3_1.
- 816 Johnson, W. H. (1997). The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *Vet*
817 *Clin North Am Food Anim Pract* 13, 255–270. doi:10.1016/s0749-0720(15)30339-x.
- 818 Karpenahalli, M. R., Lupas, A. N., and Söding, J. (2007). TPRpred: a tool for prediction of TPR-,
819 PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 8, 2.
820 doi:10.1186/1471-2105-8-2.
- 821 Kashihara, H., Chiba, S., Kanno, S.-I., Suzuki, K., Yano, T., and Tsukita, S. (2019). Cep128
822 associates with Odf2 to form the subdistal appendage of the centriole. *Genes Cells* 24, 231–
823 243. doi:10.1111/gtc.12668.
- 824 Khan, M., Jabeen, N., Khan, T., Hussain, H. M. J., Ali, A., Khan, R., et al. (2018). The evolutionarily
825 conserved genes: Tex37, Ccdc73, Prss55 and Nxt2 are dispensable for fertility in mice. *Sci*
826 *Rep* 8, 4975. doi:10.1038/s41598-018-23176-x.
- 827 Khan, R., Ye, J., Yousaf, A., Shah, W., Aftab, A., Shah, B., et al. (2020). Evolutionarily conserved
828 and testis-specific gene, 4930524B15Rik, is not essential for mouse spermatogenesis and
829 fertility. *Mol Biol Rep* 47, 5207–5213. doi:10.1007/s11033-020-05595-0.

- 830 Kleckner, N. (1996). Meiosis: how could it work? *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8167–8174.
831 doi:10.1073/pnas.93.16.8167.
- 832 Kneitz, B., Cohen, P. E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M. F., Hou, H., et al. (2000). MutS homolog
833 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in
834 male and female mice. *Genes Dev* 14, 1085–1097.
- 835 Kurihara, M., Otsuka, K., Matsubara, S., Shiraishi, A., Satake, H., and Kimura, A. P. (2017). A
836 Testis-Specific Long Non-Coding RNA, IncRNA-Tcam1, Regulates Immune-Related Genes
837 in Mouse Male Germ Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 299.
838 doi:10.3389/fendo.2017.00299.
- 839 Li, B., Nair, M., Mackay, D. R., Bilanchone, V., Hu, M., Fallahi, M., et al. (2005). Ovol1 regulates
840 meiotic pachytene progression during spermatogenesis by repressing Id2 expression.
841 *Development* 132, 1463–1473. doi:10.1242/dev.01658.
- 842 Li, C., Shen, C., Shang, X., Tang, L., Xiong, W., Ge, H., et al. (2020). Two novel testis-specific long
843 noncoding RNAs produced by *1700121C10Rik* are dispensable for male fertility in mice. *J*
844 *Reprod Dev* 66, 57–65. doi:10.1262/jrd.2019-104.
- 845 Li, K., Xu, J., Luo, Y., Zou, D., Han, R., Zhong, S., et al. (2021). Panoramic transcriptome analysis
846 and functional screening of long noncoding RNAs in mouse spermatogenesis. *Genome Res*
847 31, 13–26. doi:10.1101/gr.264333.120.
- 848 Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for
849 assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.
850 doi:10.1093/bioinformatics/btt656.
- 851 Lipkin, S. M., Moens, P. B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., et al. (2002).
852 Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* 31, 385–390.
853 doi:10.1038/ng931.
- 854 Liu, D., Matzuk, M. M., Sung, W. K., Guo, Q., Wang, P., and Wolgemuth, D. J. (1998). Cyclin A1 is
855 required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* 20, 377–380. doi:10.1038/3855.
- 856 Liu, W., He, X., Yang, S., Zouari, R., Wang, J., Wu, H., et al. (2019). Bi-allelic Mutations in
857 TTC21A Induce Asthenoteratospermia in Humans and Mice. *Am J Hum Genet* 104, 738–748.
858 doi:10.1016/j.ajhg.2019.02.020.
- 859 Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion
860 for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- 861 Lu, Y., Oura, S., Matsumura, T., Oji, A., Sakurai, N., Fujihara, Y., et al. (2019). CRISPR/Cas9-
862 mediated genome editing reveals 30 testis-enriched genes dispensable for male fertility in
863 mice†. *Biol Reprod* 101, 501–511. doi:10.1093/biolre/ioz103.
- 864 Luangpraseuth-Prosper, A., Lesueur, E., Jouneau, L., Pailhoux, E., Cotinot, C., and Mandon-Pépin,
865 B. (2015). TOPAZ1, a germ cell specific factor, is essential for male meiotic progression. *Dev*
866 *Biol* 406, 158–171. doi:10.1016/j.ydbio.2015.09.002.

- 867 Malcov, M., Cesarkas, K., Stelzer, G., Shalom, S., Dicken, Y., Naor, Y., et al. (2004). Aym1, a
868 mouse meiotic gene identified by virtue of its ability to activate early meiotic genes in the
869 yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev Biol* 276, 111–123. doi:10.1016/j.ydbio.2004.08.026.
- 870 Marjanović, M., Sánchez-Huertas, C., Terré, B., Gómez, R., Scheel, J. F., Pacheco, S., et al. (2015).
871 CEP63 deficiency promotes p53-dependent microcephaly and reveals a role for the
872 centrosome in meiotic recombination. *Nat Commun* 6, 7676. doi:10.1038/ncomms8676.
- 873 Miyata, H., Castaneda, J. M., Fujihara, Y., Yu, Z., Archambeault, D. R., Isotani, A., et al. (2016).
874 Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are
875 not required for male fertility in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 7704–7710.
876 doi:10.1073/pnas.1608458113.
- 877 Miyata, H., Morohoshi, A., and Ikawa, M. (2020a). Analysis of the sperm flagellar axoneme using
878 gene-modified mice. *Exp Anim* 69, 374–381. doi:10.1538/expanim.20-0064.
- 879 Miyata, H., Shimada, K., Morohoshi, A., Oura, S., Matsumura, T., Xu, Z., et al. (2020b). Testis-
880 enriched kinesin KIF9 is important for progressive motility in mouse spermatozoa. *FASEB J*
881 34, 5389–5400. doi:10.1096/fj.201902755R.
- 882 Monesi, V. (1964). RIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS DURING MITOSIS AND MEIOSIS IN
883 THE MOUSE TESTIS. *J Cell Biol* 22, 521–532. doi:10.1083/jcb.22.3.521.
- 884 Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., et al. (2009). The
885 PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male
886 sexual differentiation. *Development* 136, 1813–1821. doi:10.1242/dev.032631.
- 887 Mönnich, M., Borgeskov, L., Breslin, L., Jakobsen, L., Rogowski, M., Doganli, C., et al. (2018).
888 CEP128 Localizes to the Subdistal Appendages of the Mother Centriole and Regulates TGF-
889 β /BMP Signaling at the Primary Cilium. *Cell Rep* 22, 2584–2592.
890 doi:10.1016/j.celrep.2018.02.043.
- 891 Morelli, M. A., and Cohen, P. E. (2005). Not all germ cells are created equal: aspects of sexual
892 dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130, 761–781. doi:10.1530/rep.1.00865.
- 893 Morris, K. V., and Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nat Rev Genet* 15, 423–437.
894 doi:10.1038/nrg3722.
- 895 Mountain, V., and Compton, D. A. (2000). Dissecting the role of molecular motors in the mitotic
896 spindle. *Anat Rec* 261, 14–24. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(20000215)261:1<14::AID-
897 AR5>3.0.CO;2-E.
- 898 Necsulea, A., and Kaessmann, H. (2014). Evolutionary dynamics of coding and non-coding
899 transcriptomes. *Nat Rev Genet* 15, 734–748. doi:10.1038/nrg3802.
- 900 Necsulea, A., Soumillon, M., Warnefors, M., Liechti, A., Daish, T., Zeller, U., et al. (2014). The
901 evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature* 505, 635–640.
902 doi:10.1038/nature12943.

- 903 Oldknow, K. J., Seebacher, J., Goswami, T., Villen, J., Pitsillides, A. A., O’Shaughnessy, P. J., et al.
 904 (2013). Follistatin-like 3 (FSTL3) mediated silencing of transforming growth factor β (TGF β)
 905 signaling is essential for testicular aging and regulating testis size. *Endocrinology* 154, 1310–
 906 1320. doi:10.1210/en.2012-1886.
- 907 Page, J., de la Fuente, R., Manterola, M., Parra, M. T., Viera, A., Berríos, S., et al. (2012).
 908 Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes
 909 during mammalian male meiosis? *Chromosoma* 121, 307–326. doi:10.1007/s00412-012-
 910 0364-y.
- 911 Pittman, D. L., Cobb, J., Schimenti, K. J., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., et al. (1998).
 912 Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmcl, a
 913 germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1, 697–705. doi:10.1016/s1097-2765(00)80069-6.
- 914 Quan, G., and Li, J. (2018). Circular RNAs: biogenesis, expression and their potential roles in
 915 reproduction. *J Ovarian Res* 11, 9. doi:10.1186/s13048-018-0381-4.
- 916 Reinholdt, L. G., and Schimenti, J. C. (2005). Mei1 is epistatic to Dmcl during mouse meiosis.
 917 *Chromosoma* 114, 127–134. doi:10.1007/s00412-005-0346-4.
- 918 Rey-Ares, V., Rossi, S. P., Dietrich, K.-G., Köhn, F.-M., Schwarzer, J. U., Welter, H., et al. (2018).
 919 Prostaglandin E2 (PGE2) is a testicular peritubular cell-derived factor involved in human
 920 testicular homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 473, 217–224. doi:10.1016/j.mce.2018.01.022.
- 921 Romanienko, P. J., and Camerini-Otero, R. D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic
 922 chromosome synapsis. *Mol Cell* 6, 975–987. doi:10.1016/s1097-2765(00)00097-6.
- 923 Sarropoulos, I., Marin, R., Cardoso-Moreira, M., and Kaessmann, H. (2019). Developmental
 924 dynamics of lncRNAs across mammalian organs and species. *Nature* 571, 510–514.
 925 doi:10.1038/s41586-019-1341-x.
- 926 Schmitz-Linneweber, C., and Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for
 927 organelle gene expression. *Trends Plant Sci* 13, 663–670. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.001.
- 928 Shamoto, N., Narita, K., Kubo, T., Oda, T., and Takeda, S. (2018). CFAP70 Is a Novel Axoneme-
 929 Binding Protein That Localizes at the Base of the Outer Dynein Arm and Regulates Ciliary
 930 Motility. *Cells* 7. doi:10.3390/cells7090124.
- 931 Shibuya, H., and Watanabe, Y. (2014). The meiosis-specific modification of mammalian telomeres.
 932 *Cell Cycle* 13, 2024–2028. doi:10.4161/cc.29350.
- 933 Sleutels, F., Zwart, R., and Barlow, D. P. (2002). The non-coding Air RNA is required for silencing
 934 autosomal imprinted genes. *Nature* 415, 810–813. doi:10.1038/415810a.
- 935 Soumillon, M., Necsulea, A., Weier, M., Brawand, D., Zhang, X., Gu, H., et al. (2013). Cellular
 936 source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Rep*
 937 3, 2179–2190. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.031.

- 938 Su, Y., Li, Y., and Ye, P. (2011). Mammalian meiosis is more conserved by sex than by species:
 939 conserved co-expression networks of meiotic prophase. *Reproduction* 142, 675–687.
 940 doi:10.1530/REP-11-0260.
- 941 Sutton, K. A., Jungnickel, M. K., and Florman, H. M. (2008). A polycystin-1 controls postcopulatory
 942 reproductive selection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8661–8666.
 943 doi:10.1073/pnas.0800603105.
- 944 Takaishi, M., and Huh, N. h (1999). A tetratricopeptide repeat-containing protein gene, *tpis*, whose
 945 expression is induced with differentiation of spermatogenic cells. *Biochem Biophys Res*
 946 *Commun* 264, 81–85. doi:10.1006/bbrc.1999.1477.
- 947 Tarulli, G. A., Stanton, P. G., Lerchl, A., and Meachem, S. J. (2006). Adult sertoli cells are not
 948 terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and
 949 junction protein organization. *Biol Reprod* 74, 798–806. doi:10.1095/biolreprod.105.050450.
- 950 Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., and Noce, T. (2000). Expression
 951 and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell
 952 development. *Mech Dev* 93, 139–149. doi:10.1016/s0925-4773(00)00283-5.
- 953 Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-
 954 Seq. *Bioinformatics* 25, 1105–1111. doi:10.1093/bioinformatics/btp120.
- 955 Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamarast, N., Wang, J. K., Lan, F., et al. (2010). Long
 956 noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329, 689–
 957 693. doi:10.1126/science.1192002.
- 958 Vedrenne, C., and Hauri, H.-P. (2006). Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active
 959 membrane expansion. *Traffic* 7, 639–646. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00419.x.
- 960 Wang, F., Kong, S., Hu, X., Li, X., Xu, B., Yue, Q., et al. (2020). Dnajb8, a target gene of SOX30, is
 961 dispensable for male fertility in mice. *PeerJ* 8, e10582. doi:10.7717/peerj.10582.
- 962 Wen, K., Yang, L., Xiong, T., Di, C., Ma, D., Wu, M., et al. (2016). Critical roles of long noncoding
 963 RNAs in Drosophila spermatogenesis. *Genome Res* 26, 1233–1244.
 964 doi:10.1101/gr.199547.115.
- 965 Wichman, L., Somasundaram, S., Breindel, C., Valerio, D. M., McCarrey, J. R., Hodges, C. A., et al.
 966 (2017). Dynamic expression of long noncoding RNAs reveals their potential roles in
 967 spermatogenesis and fertility. *Biol Reprod* 97, 313–323. doi:10.1093/biolre/iox084.
- 968 Yadav, R. P., and Kotaja, N. (2014). Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 382,
 969 498–508. doi:10.1016/j.mce.2013.04.015.
- 970 Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., and Höög, C. (2000). The murine SCP3
 971 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male
 972 fertility. *Mol Cell* 5, 73–83. doi:10.1016/s1097-2765(00)80404-9.

973 Zhang, B., Arun, G., Mao, Y. S., Lazar, Z., Hung, G., Bhattacharjee, G., et al. (2012). The lncRNA
 974 Malat1 is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role
 975 in the adult. *Cell Rep* 2, 111–123. doi:10.1016/j.celrep.2012.06.003.

976 Zhang, L., Lu, H., Xin, D., Cheng, H., and Zhou, R. (2010). A novel ncRNA gene from mouse
 977 chromosome 5 trans-splices with Dmrt1 on chromosome 19. *Biochem Biophys Res Commun*
 978 400, 696–700. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.130.

979 Zhu, Y., Lin, Y., He, Y., Wang, H., Chen, S., Li, Z., et al. (2020). Deletion of lncRNA5512 has no
 980 effect on spermatogenesis and reproduction in mice. *Reprod Fertil Dev* 32, 706–713.
 981 doi:10.1071/RD19246.

982

983 7 Figures legends

984 **Figure 1: WT vs *Topaz1*^{-/-} deregulated gene analysis from mouse testes.**

985 (A) Venn diagram showing the overlap of differentially expressed genes between P16 and P18
 986 *Topaz1*^{-/-} mouse testes (adjusted p<0.05 and down-regulated FC<0.5 (log₂FC<-1) or up-regulated
 987 FC>2 (log₂FC>1)). (B) Clustergrammer was generated by the Enrichr website. Top 10 enriched
 988 tissues are the columns, input genes (2748 DEGs of P18 *Topaz1*^{-/-} compared to normal testes) are the
 989 rows, and cells in the matrix indicate whether a DEG is associated with a tissue from the Mouse
 990 Gene Atlas. (C-D) Biotype of DEGs in *Topaz1*^{-/-} testes at (C) P16 and (D) P18. Around half of them
 991 are protein-coding genes whereas around one quarter is ncRNA at both developmental stages. (E-F)
 992 Biotype of DEGs in *Topaz1*^{-/-} testes at (E) P16 and (F) P18, depending on whether they were up- or
 993 down-regulated.

994

995 **Figure 2: Abnormal metaphase phenotype in *Topaz1*-deficient gonads.**

996 Immunofluorescence staining for α-TUBULIN (red), γ-TUBULIN (green) and DAPI (blue) in WT
 997 (left) and *Topaz1*^{-/-} (right) 28 dpp testes sections. Unlike the meiotic metaphases seen in normal testes
 998 (left), the metaphases are abnormal in *Topaz1*^{-/-} mutants (right) with atypical rosette shape and
 999 hemispindle. Scale bar = 20μm

1000

1001 **Figure 3: Expression analysis of three lncRNAs.**

1002 (A-C-E) RT-qPCR analysis of three different lncRNAs. (A) *4930463O16Rik*; (C) *Gm21269*; (E)
 1003 *4921513H07Rik* in different two month-old tissues from WT mice. The red lines represent the
 1004 median for each tissue; n=5 for testes and n=3 for other organs. Statistical analyses were performed
 1005 using the non-parametric Kruskal-Wallis test. * = p<0.05 (B-D-F) Schematic representation of the
 1006 results of (B) *4930463O16Rik*, (D) *Gm21269* and (F) *4921513H07Rik* ISH expression in meiotic
 1007 and post-meiotic cells of the WT mouse seminiferous epithelial cycle.

1008

1009 **Figure 4: lncRNA cellular localizations on WT two month-old mouse testes.**

1010 *In situ* hybridization using (A) *4930463O16Rik*, (D) *Gm21269* and (G) *4921513H07Rik* probes (red).
 1011 (B-E-H) Immunofluorescence staining with DDX4 antibody was achieved at the same stage of
 1012 seminiferous epithelium to identify male germ cells (green). (C-F-I) DAPI (blue), visualizing nuclear
 1013 chromosomes, was merged with *ISH* (green) and IF (red) signals. Zooms in white squares show
 1014 spermatocytes during the first meiotic division (zygotene to diplotene stages). Zooms in circles show
 1015 spermatid cells with one spot of DDX4 staining per cell. Scale bar = 20 μm .

1016

1017 **Figure 5: Deletion of the *4930463O16Rik* gene in the mouse.**

1018 (A) Schematic design of CRISPR/Cas9 deletion of the *4930463O16Rik* gene with the suppression of
 1019 4 exons and 3 introns. The white boxes and lines represent exons and introns, respectively. (B) PCR
 1020 genotyping on DNA of WT and *4930463O16Rik*^{-/-} mice. The primer pairs used 1F/4R (located in 5'
 1021 of exon 1 and in 3' of exon 4 of the *4930463O16Rik* gene, respectively) or 2F/2R (located in the
 1022 exon2 of *4930463O16Rik*) to determine the genotypes of the mice. Results showed the following
 1023 amplicon sizes: (*) 352 bp with the 2F/2R primers in WT (no amplification in mutant mice); (#) 935
 1024 bp with the 1F/4R primers in *4930463O16Rik*^{-/-} mice (no amplification in WT mice under the PCR
 1025 conditions used). (L) DNA ladder. (C) Transcription of the forward strand of chromosome 10 around
 1026 the *4930463O16Rik* gene with RNA-seq coverage (BigWig format representation) in WT (top blue
 1027 tracks) and *4930463O16Rik*^{-/-} (bottom tracks) mouse P18 testes. A continuous (WT) or very low
 1028 transcription (*4930463O16Rik*^{-/-}) was observed from *4930463O16Rik* to *E230014E18Rik* genes. (D)
 1029 Electrophoregram of *4930463O16Rik*^{-/-} mouse genomic DNA showing 9997 bp deletion and the
 1030 insertion of 3 nucleotides (GTT, highlighted in pink).

1031

1032 **Figure 6: Study of *4930463O16Rik*^{-/-} testicular phenotype.**

1033 (A) Testis/body weight ratio of 8 week-old mice. No significant difference was observed in the two
 1034 mouse lines. Median lines are in black. (B) Hematoxylin and eosin (HE) staining of testis and
 1035 epididymis sections from WT and *4930463O16Rik*^{-/-} 8 week-old mice. Scale bar=50 μm .
 1036 Spermatozoa were visible in the lumen of the testes and epididymis of WT and *4930463O16Rik*^{-/-}
 1037 mice. (C) Quantification of the different seminiferous epithelium stages in WT and *4930463O16Rik*^{-/-}
 1038 8 week-old mice. No significant difference was found between WT and *4930463O16Rik*^{-/-} mice.

1039

1040 **Figure 7: Evaluation of sperm parameters.**

1041 Comparison of sperm-specific parameters from WT (circle, n=11) and *4930463O16Rik*^{-/-} (square,
 1042 n=20) mice. Significantly affected sperm parameters were (A) spermatozoa concentration (10⁶/mL),
 1043 (B) spermatozoa motility (%), (C) motile mean bcf (beat cross frequency), (D) progressive
 1044 spermatozoa (%), (E) DMR (distal midpiece reflex, abnormality of the sperm tail (%), (F)
 1045 spermatozoa with coiled tail (%), (G) motile mean VSL ($\mu\text{m/s}$) and (H) VAP ($\mu\text{m/s}$). Statistical
 1046 analyses were performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test. * = p-val<0.05, ** = p-
 1047 val<0.01.

1048

1049 **Figure 8: Deregulated genes from 4930463O16Rik^{-/-} mouse testes.**

1050 (A) Biotype of differentially expressed genes at P18 in 4930463O16Rik^{-/-} testes. Most of the
 1051 deregulated genes are coding protein genes (adjusted p<0.05 and down-regulated FC<2 (log2FC<-1)
 1052 or up-regulated FC>2 (log2FC>1). (B) Venn diagram showing the overlap of differentially expressed
 1053 genes between 4930463O16Rik^{-/-} and Topaz1^{-/-} mouse testes at 18 dpp.

1054

1055 **8 Supplementary Material**

1056 **Supplementary Figure 1.** Validation of several DEGs by RT-qPCR (RNA-seq Topaz1^{-/-} vs WT
 1057 testes). Validation of several differentially expressed up- or down-regulated genes and of non-DEGs
 1058 from RNA-seq analysis by qRT-PCR from P16 (A) or P18 (B) mouse testis RNAs. The lines
 1059 represent the median of each genotype (blue: WT; red: Topaz1^{-/-}). A Kruskal-Wallis statistical test
 1060 was performed (*p<0.05).

1061

1062 **Supplementary Figure 2.** Abnormal centrosome labeling in Topaz1-deficient gonads.
 1063 Immunofluorescence staining for γ -TUBULIN (red) and DAPI (blue) in WT (left) and Topaz1^{-/-}
 1064 (right) 30 dpp testes sections. Unlike the two red dots locating centrosomes in the meiotic metaphases
 1065 seen in normal testes (left), centrosomes are abnormal in Topaz1^{-/-} mutants (right) with one diffuse
 1066 labeling. Zooms in white squares show spermatocytes in metaphase I (WT) or in metaphase I-like
 1067 (Topaz1^{-/-}) spermatocytes. Scale bar = 50 μ m.

1068

1069 **Supplementary Figure 3.** Repro-genomic data on the dynamic expression of 4930463O16Rik. The
 1070 dynamic expression of 4930463O16Rik in five different tissues from male and female adult mice (A),
 1071 and in embryonic primordial germ cells and adult male germ cells (B). 4930463O16Rik is expressed
 1072 in testes in germ cells during post-natal life. The strongest dynamic expression is found in pachytene
 1073 spermatocytes.

1074

1075 **Supplementary Figure 4.** Repro-genomic data on the dynamic expression of Gm21269. The dynamic
 1076 expression of Gm21269 in five different tissues from male and female adult mice (A), in embryonic
 1077 primordial germ cells and adult male germ cells (B). Gm21269 is expressed in testes in germ cells
 1078 during post-natal life. The strongest dynamic expression is found in pachytene spermatocytes.

1079

1080 **Supplementary Figure 5.** IGV representation of P18-testis RNA-seq. Expression of 4930463O16Rik
 1081 (A), Gm21269 (B) and 4921513H07Rik (C) from BigWig files of strand-specific RNA-seq data. The
 1082 first four tracks represent transcripts of WT testes at P18; the next three tracks represent transcripts of
 1083 Topaz1^{-/-} testes at the same developmental stage. Representations of the genes (from mm10 or
 1084 GRCm38) are shown at the bottom of each graph. A representation of the size of 4930463O16Rik

1085 (A), *Gm21269* (B) and *492151H07Rik* (C) transcripts (red) from Ensembl data (GRCm38) is shown
 1086 at the top. *4930463O16Rik* and *4921513H07Rik* gene transcriptions overlap in 3' or 5', respectively.

1087

1088 **Supplementary Figure 6.** Expression of *Gm21269*, *4930463O16Rik* and *492151H07Rik* mRNAs in
 1089 testes from 5 days to adulthood. Quantitative RT-PCR analysis of *Gm21269*, *4930463O16Rik* and
 1090 *492151H07Rik* gene expressions at different developmental stages in WT (blue) and *Topaz1*^{-/-} (red)
 1091 testes. The lines represent the median of each genotype. A Kruskal-Wallis statistical test was
 1092 performed (*p<0.05; **p<0.01).

1093

1094 **Supplementary Figure 7.** ISH with PAS counterstained in WT mouse testes. Visualization of
 1095 *4930463O16Rik* (A), *Gm21269* (B) and *4921513H07Rik* (C) mRNAs, respectively, by ISH at
 1096 different seminiferous epithelium stages highlighted by PAS staining. Scale bar = 20µm

1097

1098 **Supplementary Figure 8.** LncRNA cellular localizations in testes from two month-old WT mice.
 1099 ISH using (A) *4930463O16Rik*, (D) *Gm21269* and (G) *4921513H07Rik* probes (red). (B-E-H)
 1100 Immunofluorescence staining with γH2Ax antibody was performed at the same stage of seminiferous
 1101 epithelium to identify male germ cells (green). (C-F-I) DAPI (blue), visualizing nuclear
 1102 chromosomes, was merged with ISH (green) and IF (red) signals. Zooms in white squares show
 1103 spermatocytes during prophase I. No colocation between the sex body (γH2Ax) and lncRNAs (red)
 1104 was evident. Scale bar = 20 µm.

1105

1106 **Supplementary Figure 9.** Validation of several DEGs by RT-qPCR (RNA-seq *4930463O16Rik*^{-/-} vs
 1107 WT testes). Validation of several differentially expressed up- or down-regulated genes and of non-
 1108 DEGs of RNA-seq analysis by RT-qPCR from P16 (A) or P18 (B) mouse testis RNAs. The lines
 1109 represent the median of each genotype (blue: WT; red: *4930463O16Rik*^{-/-}). A Kruskal-Wallis
 1110 statistical test was performed (*p<0.05).

1111

1112 **Supplementary Table 1.** List of DEGs in *Topaz1*^{-/-} testes compared to WT. List of deregulated genes
 1113 in *Topaz1* KO testes at P16 (sheet 1) and P18 (sheet 2) (adjusted p-value <0.05 and absolute
 1114 Log₂FC>1).

1115

1116 **Supplementary Table 2.** Functional annotation of P16 DEGs (RNA-seq *Topaz1*^{-/-} vs WT testes).
 1117 DAVID functional Annotation Clustering (DAVID 6.8) analysis (based on GO terms and KEGG
 1118 pathway) of all P16-differentially expressed genes (sheet 1) or only up-regulated DEGs (sheet 2) or
 1119 down-regulated DEGs (sheet 3) in *Topaz1*^{-/-} testes.

1120

1121 **Supplementary Table 3.** Functional annotation of P18 DEGs (RNA-seq *Topaz1*^{-/-} vs WT testes).
1122 DAVID functional Annotation Clustering (DAVID 6.8) analysis (based on GO terms and KEGG
1123 pathway) of P18-differentially expressed genes (sheet 1) or only up-regulated DEGs (sheet 2) or
1124 down-regulated DEGs (sheet 3) in *Topaz1*^{-/-} testes. Annotation clusters based on the InterPro
1125 database of P18-down-regulated DEGs are mentioned in sheet 4.

1126

1127 **Supplementary Table 4.** List of primers. List of different primers used during this study for
1128 genotyping, RT-qPCR and gRNAs.

1129

1130 **Supplementary Table 5.** List of DEGs in *4930463O16Rik*^{-/-} testes compared to WT. List of
1131 deregulated genes in *4930463O16Rik* KO testes at P16 (sheet 1) and P18 (sheet 2) (adjusted p-
1132 value <0.05 and absolute Log2FC>1).

1133

1134 **Supplementary Table 6.** Functional annotation of P18 DEGs (RNA-seq *4930463O16Rik*^{-/-} vs WT
1135 testes). DAVID functional Annotation Clustering (DAVID 6.8) analysis of P18-differentially
1136 expressed genes (sheet 1) or only up-regulated (sheet 2) or down-regulated DEGs (sheet 3) in
1137 *4930463O16Rik*^{-/-} testes.

1138

1139 **Supplementary Table 7.** Casa system settings.

1140

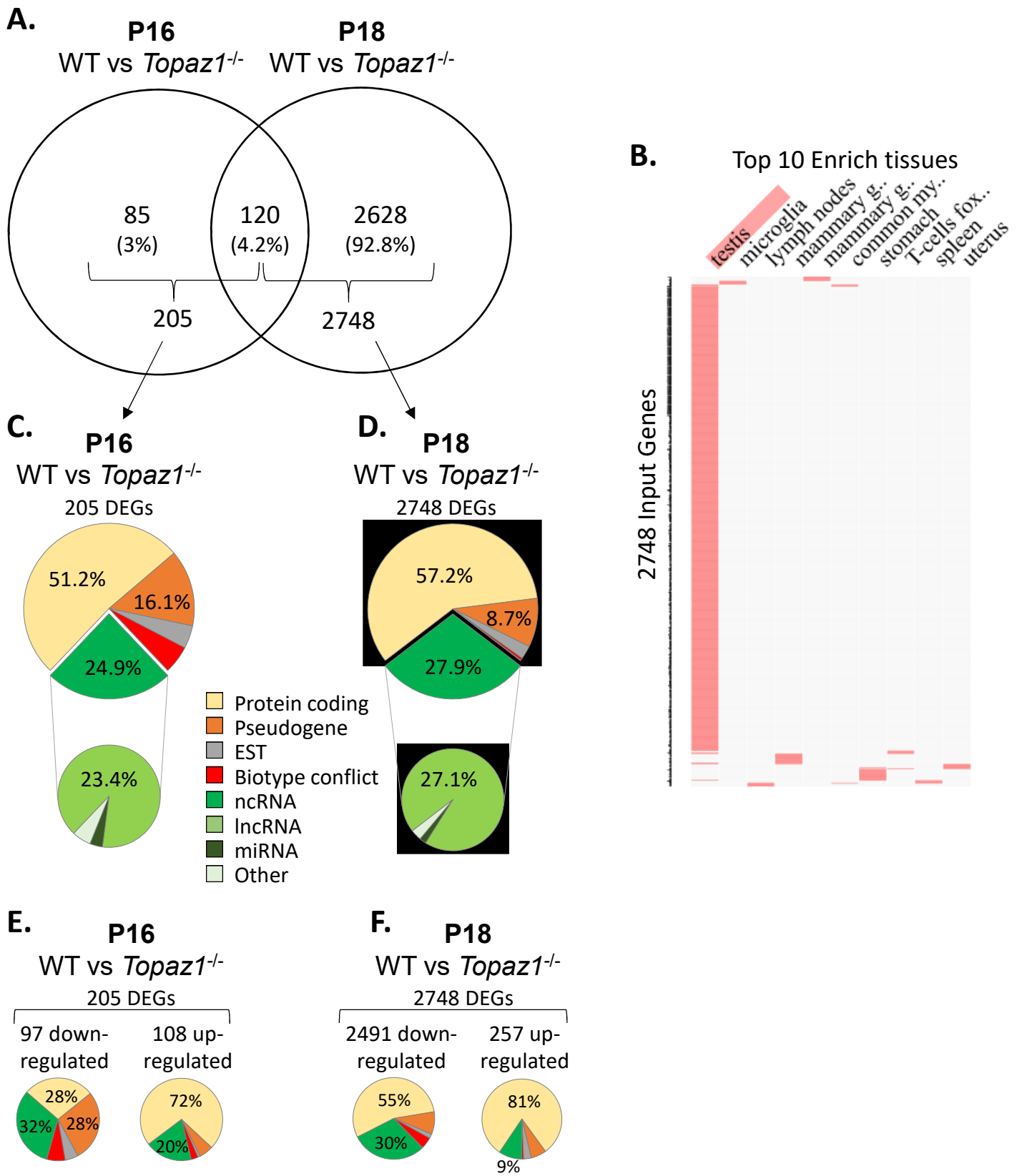


Figure 1

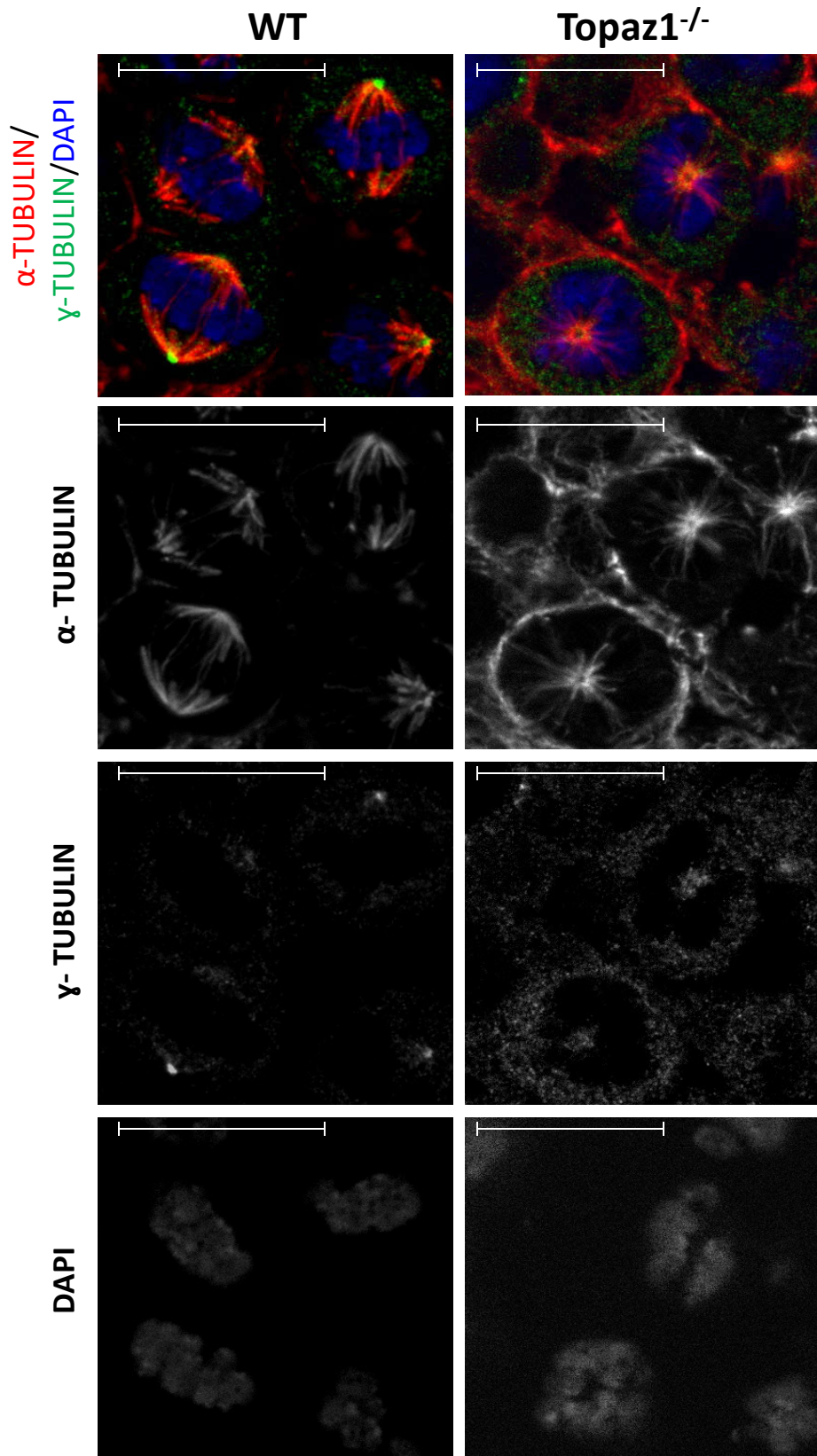


Figure 2

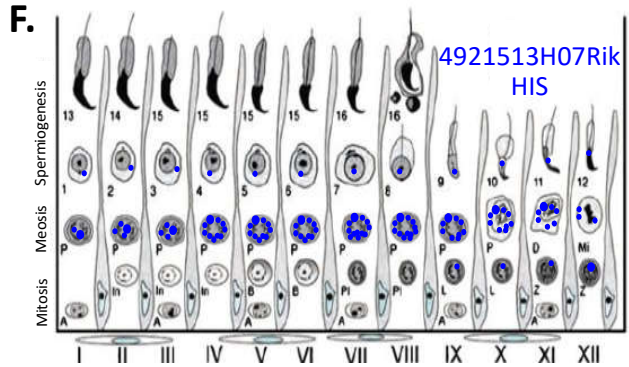
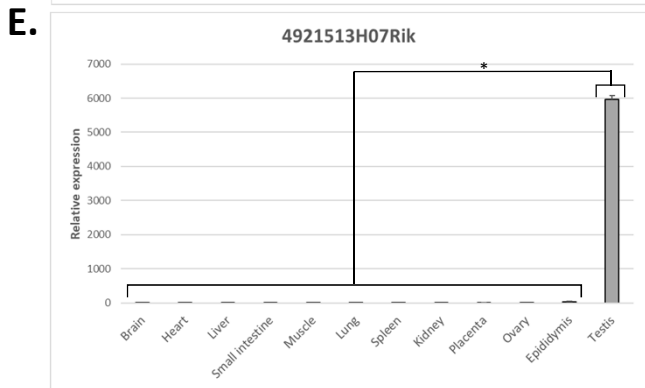
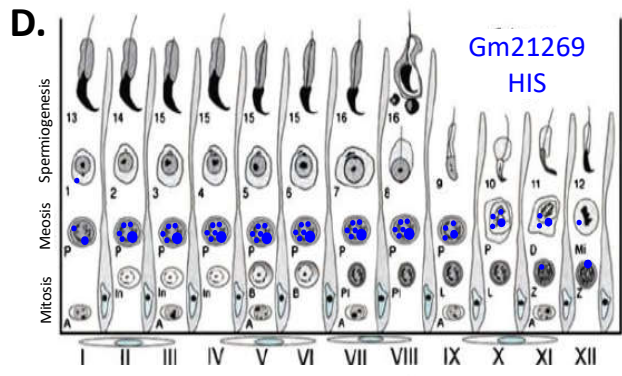
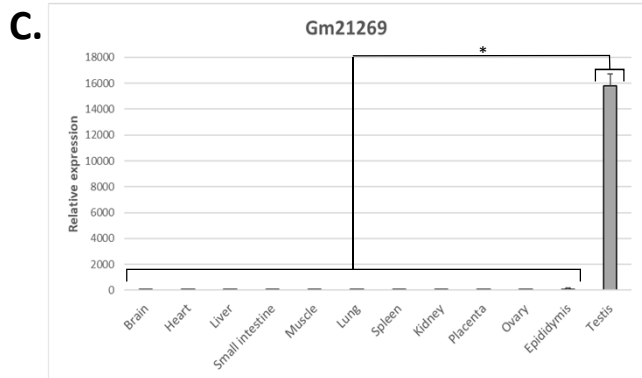
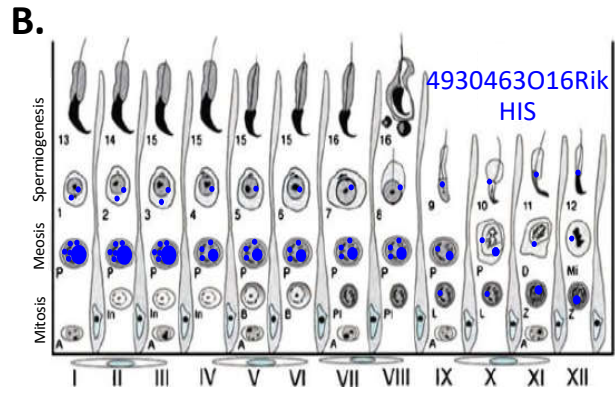
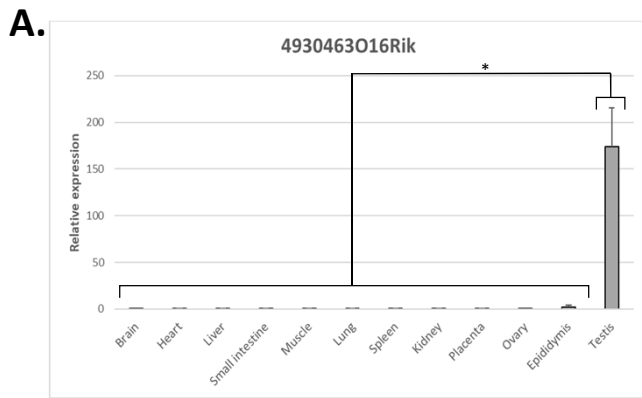


Figure 3

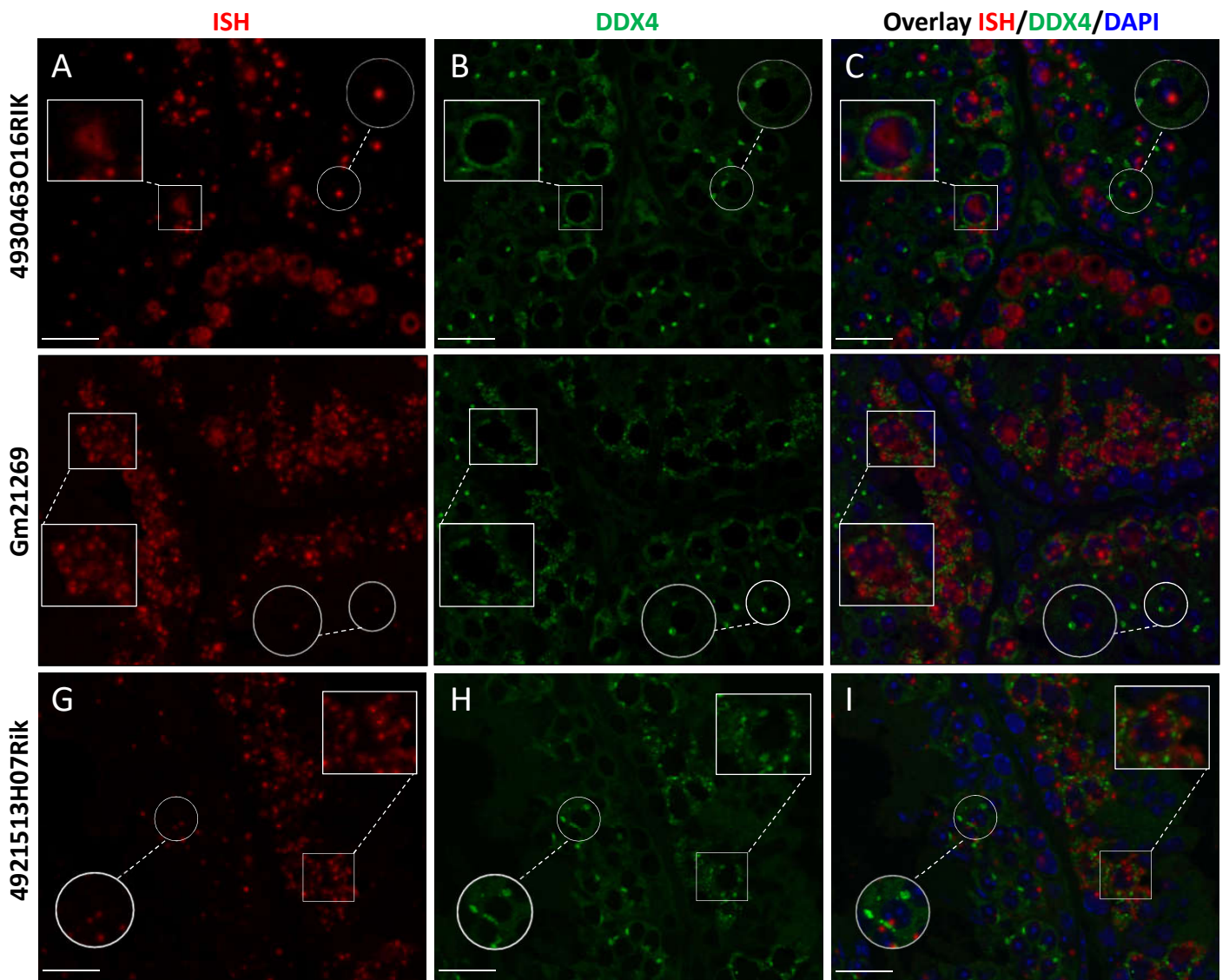


Figure 4

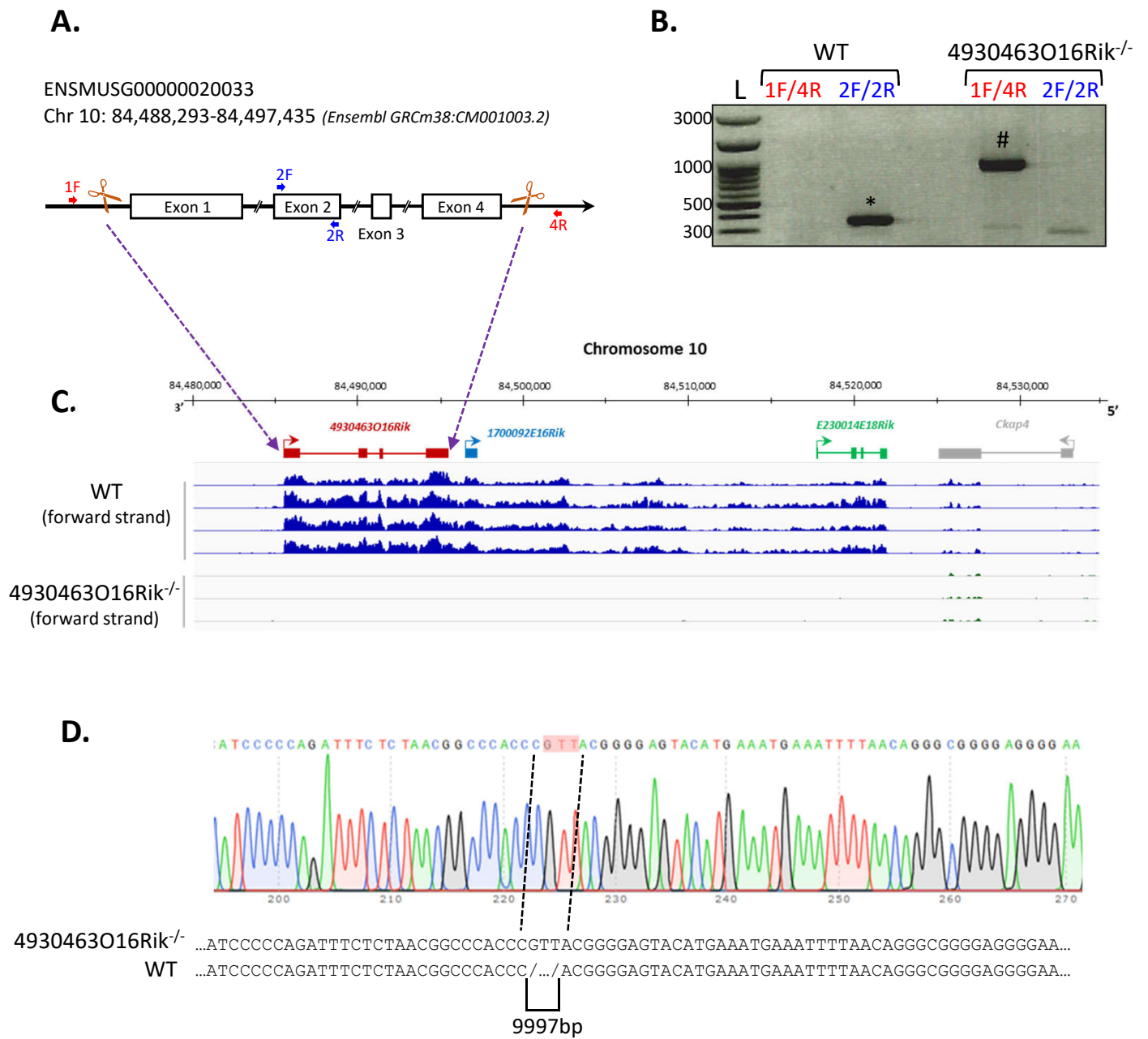


Figure 5

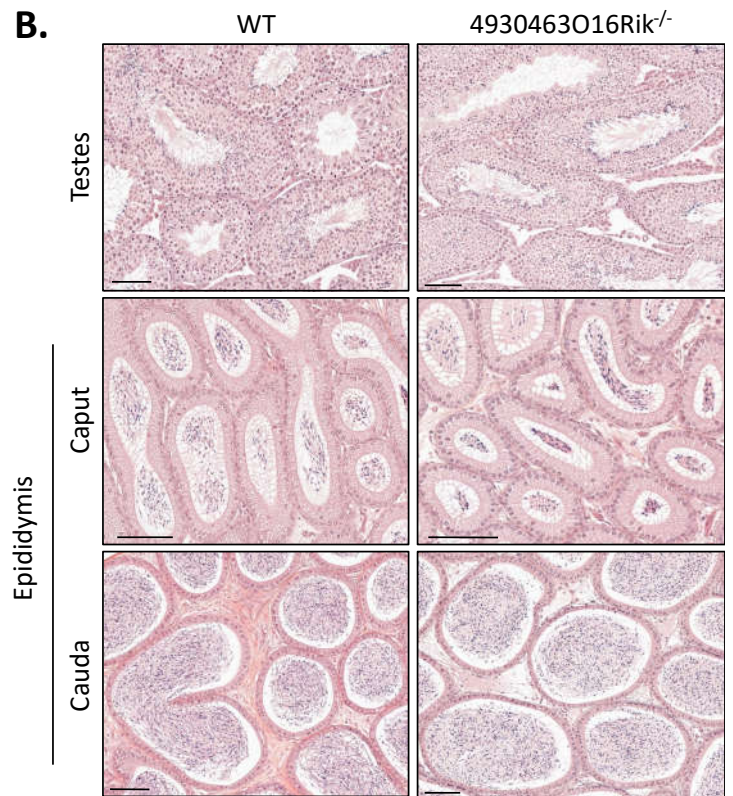
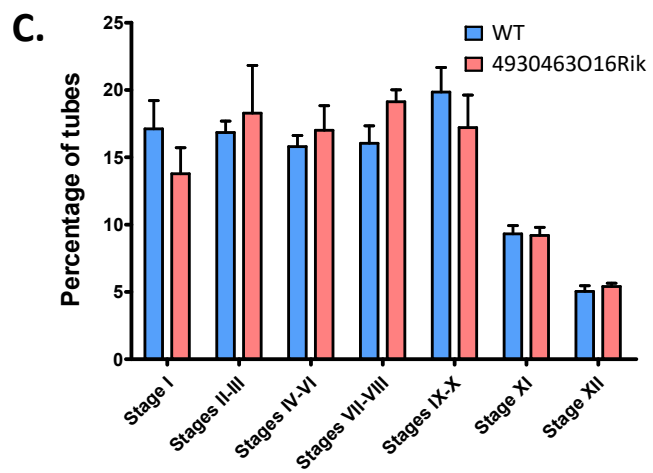
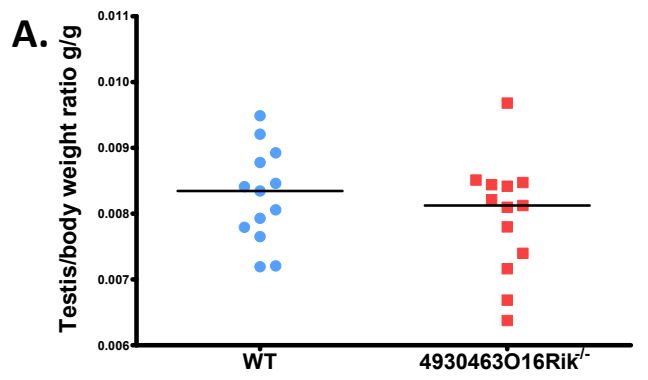


Figure 6

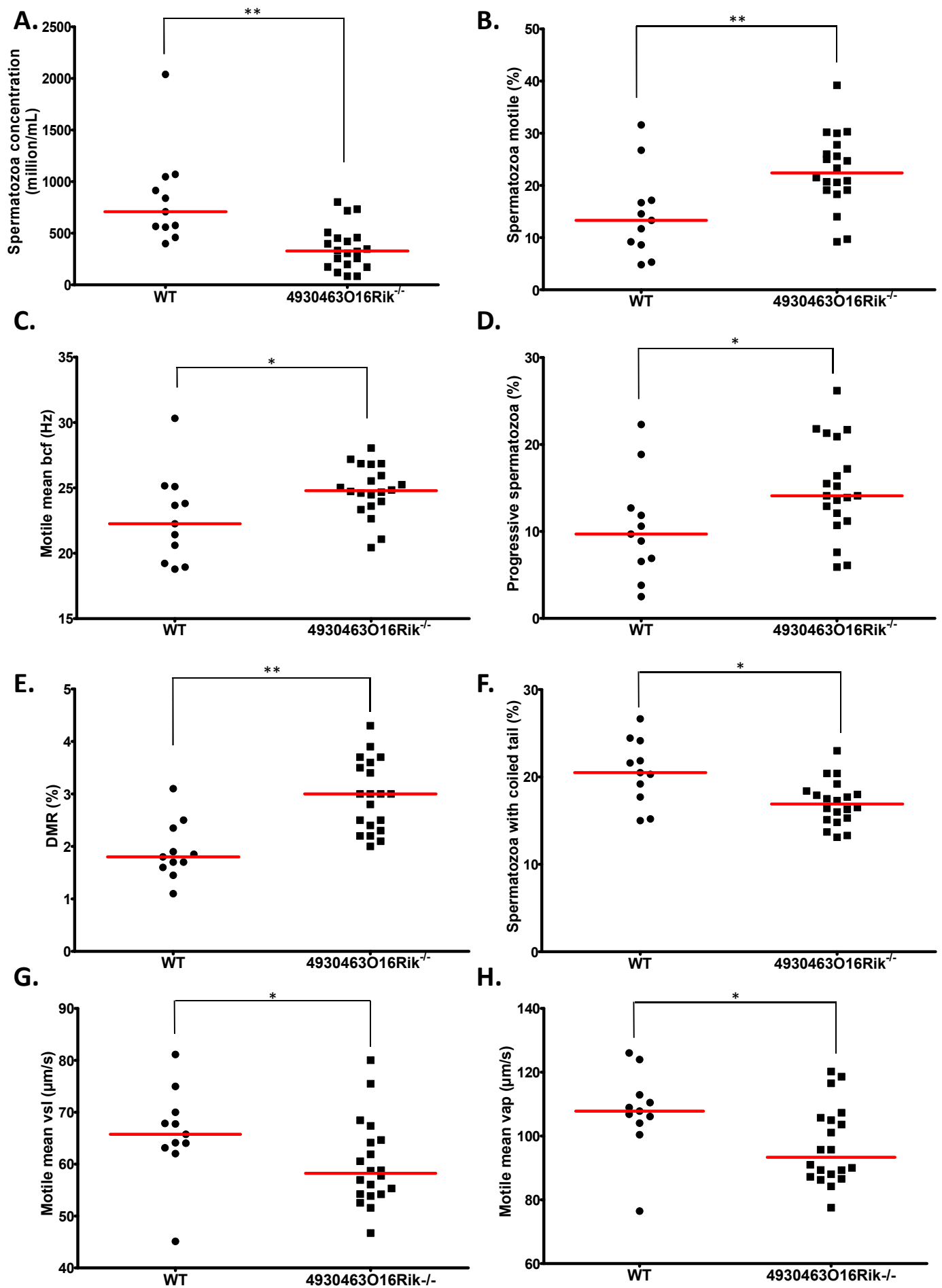


Figure 7

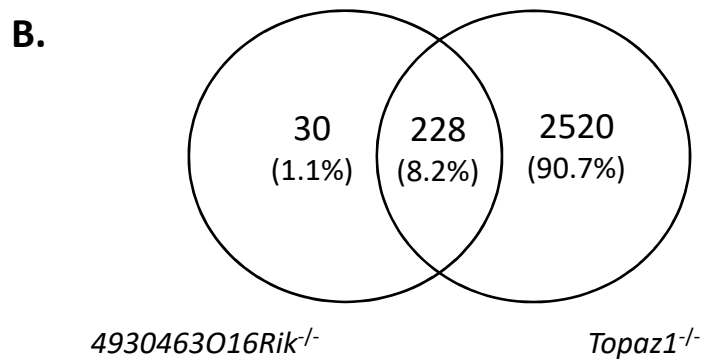
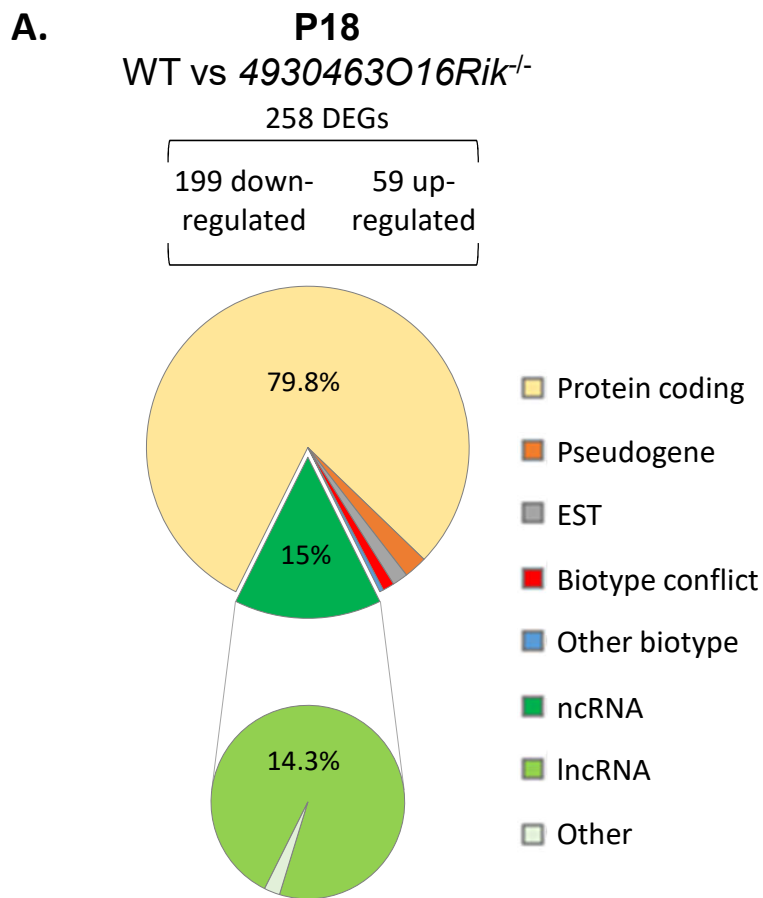
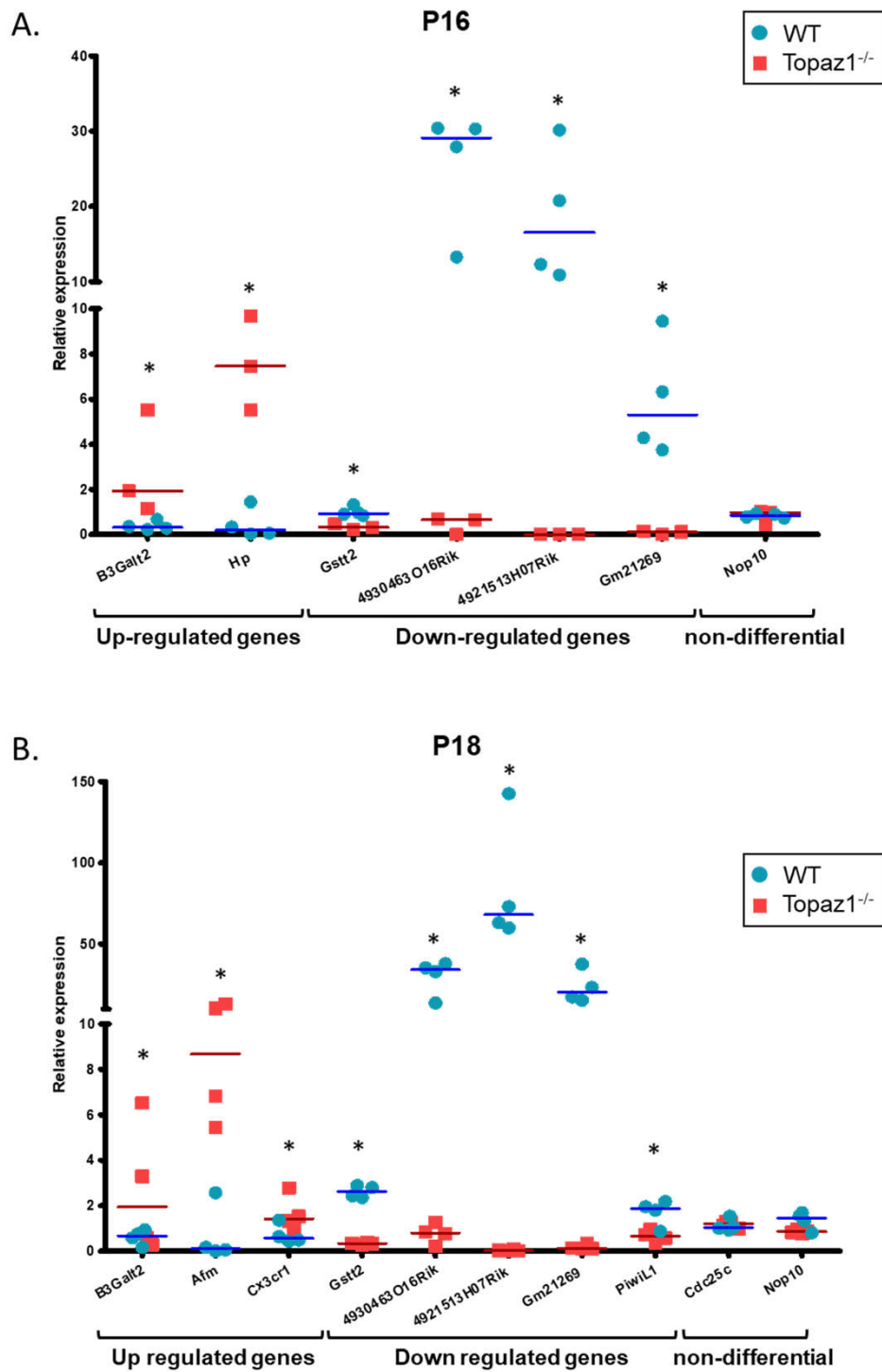
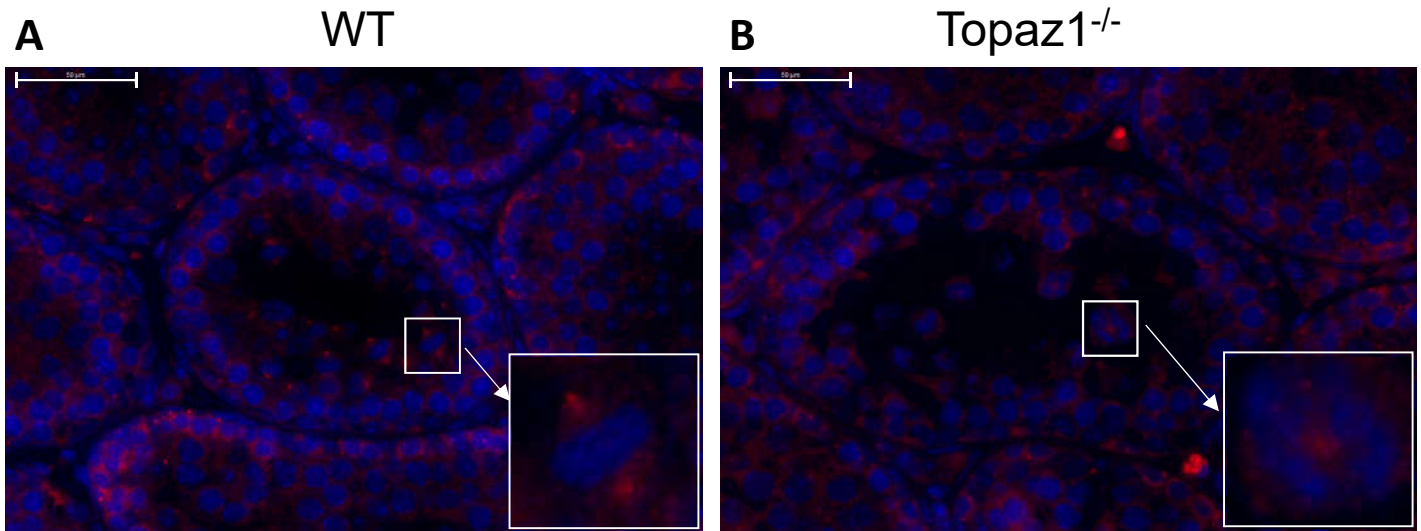


Figure 8

Supplementary Figures:



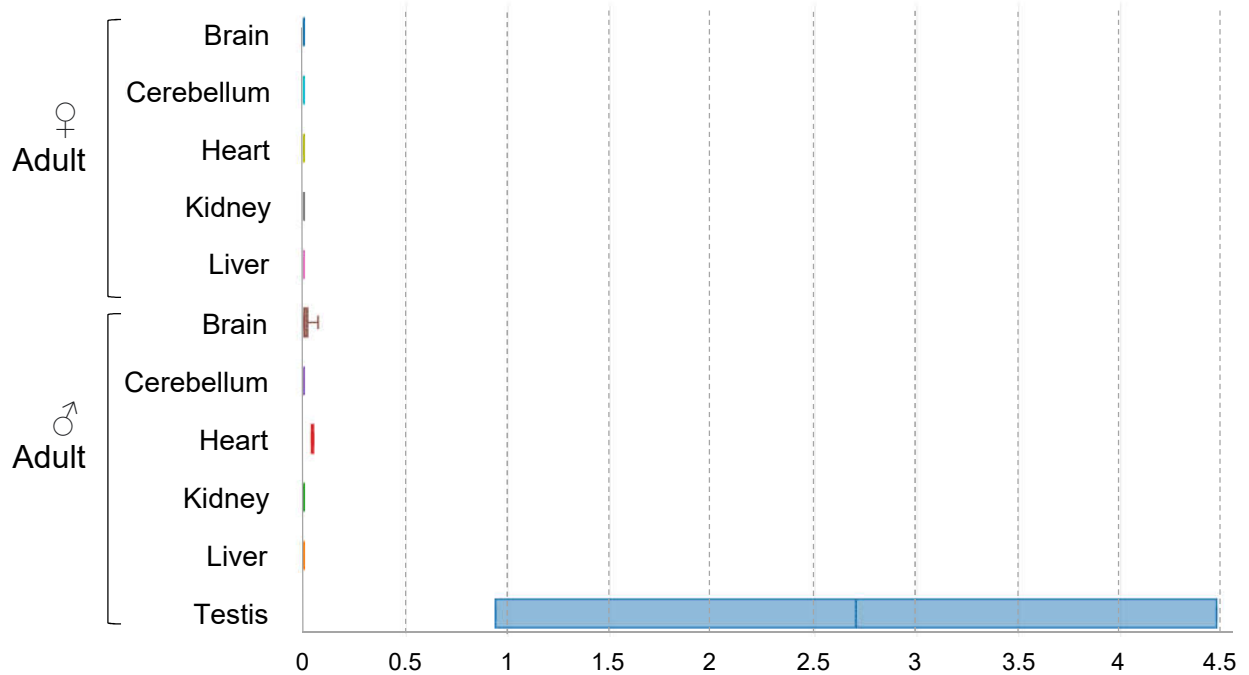
Supplementary Figure 1. Validation of several DEGs by RT-qPCR (RNA-seq *Topaz1*^{-/-} vs WT testes). Validation of several differentially expressed up- or down-regulated genes and of non-DEGs from RNA-seq analysis by qRT-PCR from P16 (A) or P18 (B) mouse testis RNAs. The lines represent the median of each genotype (blue: WT; red: *Topaz1*^{-/-}). A Kruskal-Wallis statistical test was performed (*p<0.05).



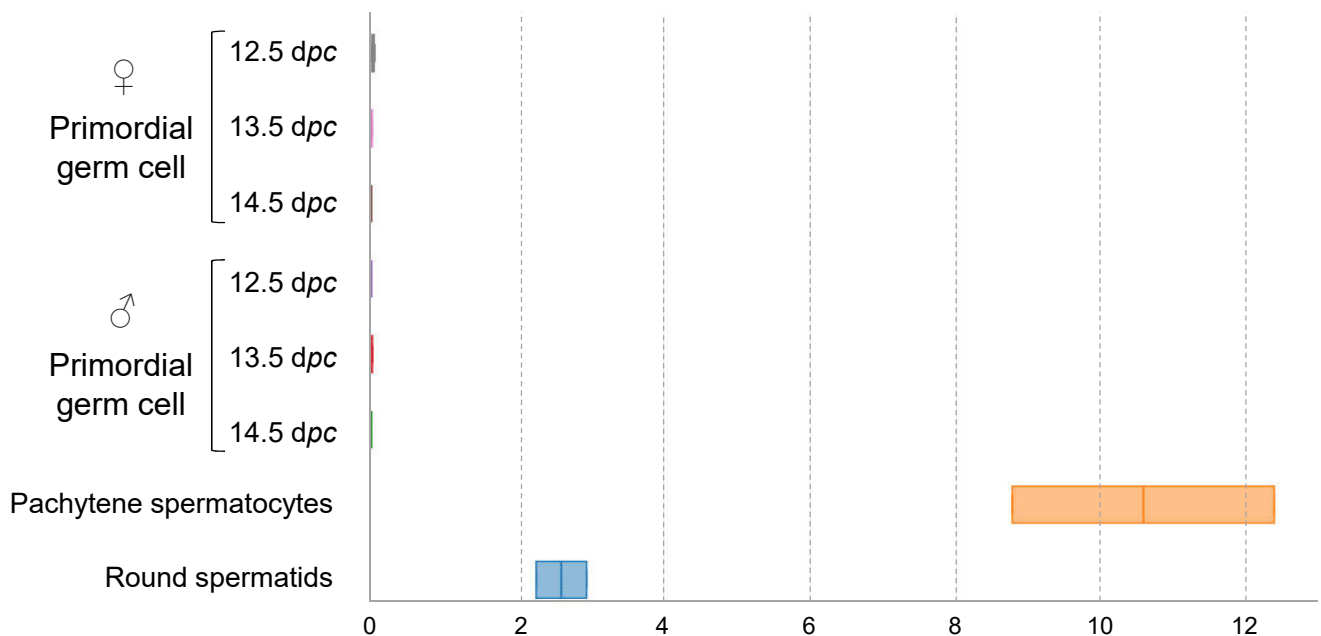
Supplementary Figure 2. Abnormal centrosome labeling in *Topaz1*-deficient gonads. Immunofluorescence staining for γ -TUBULIN (red) and DAPI (blue) in WT (left) and *Topaz1*^{-/-} (right) 30 *dpp* testes sections. Unlike the two red dots locating centrosomes in the meiotic metaphases seen in normal testes (left), centrosomes are abnormal in *Topaz1*^{-/-} mutants (right) with one diffuse labeling. Zooms in white squares show spermatocytes in metaphase I (WT) or in metaphase I-like (*Topaz1*^{-/-}) spermatocytes. Scale bar = 50µm.

Dynamic expression of 4930463O16Rik

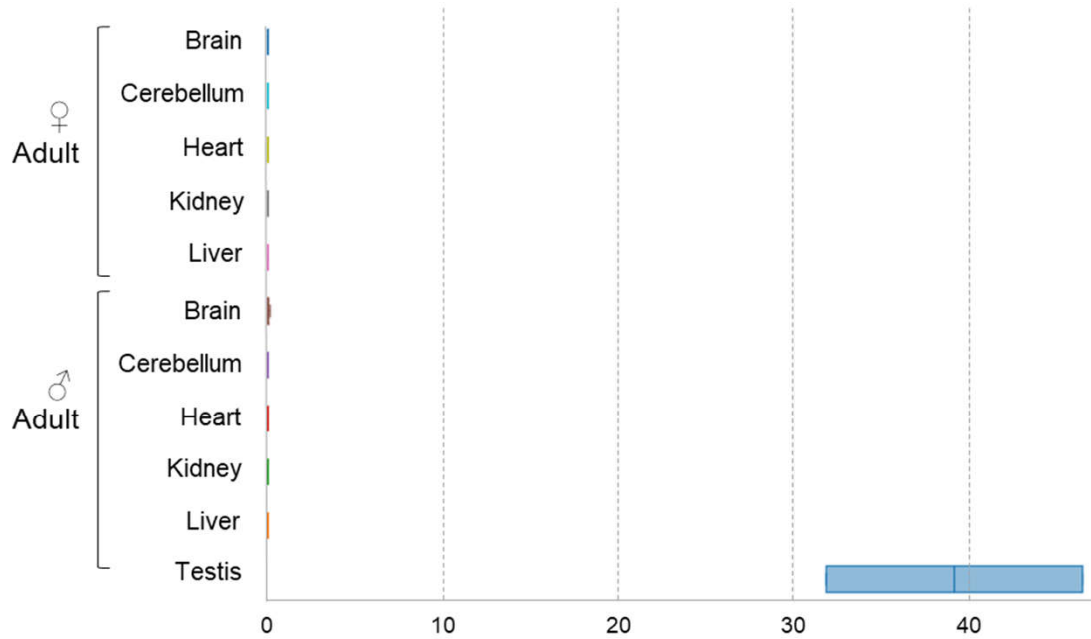
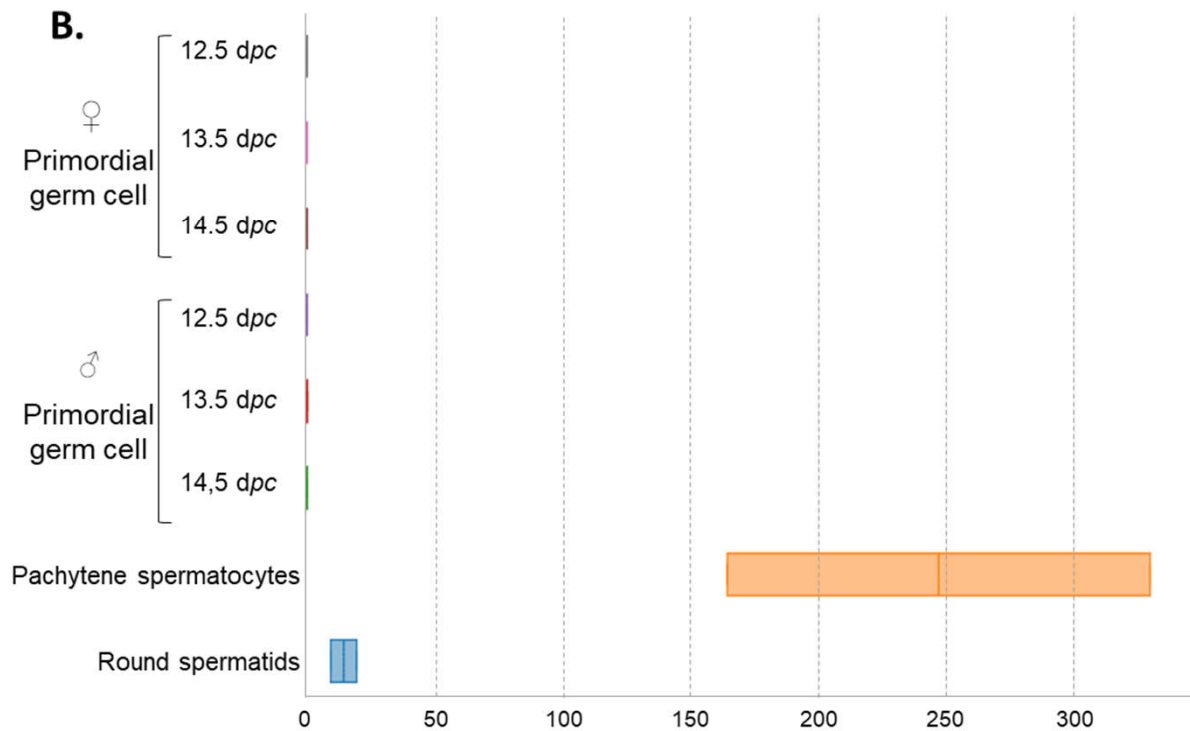
A.



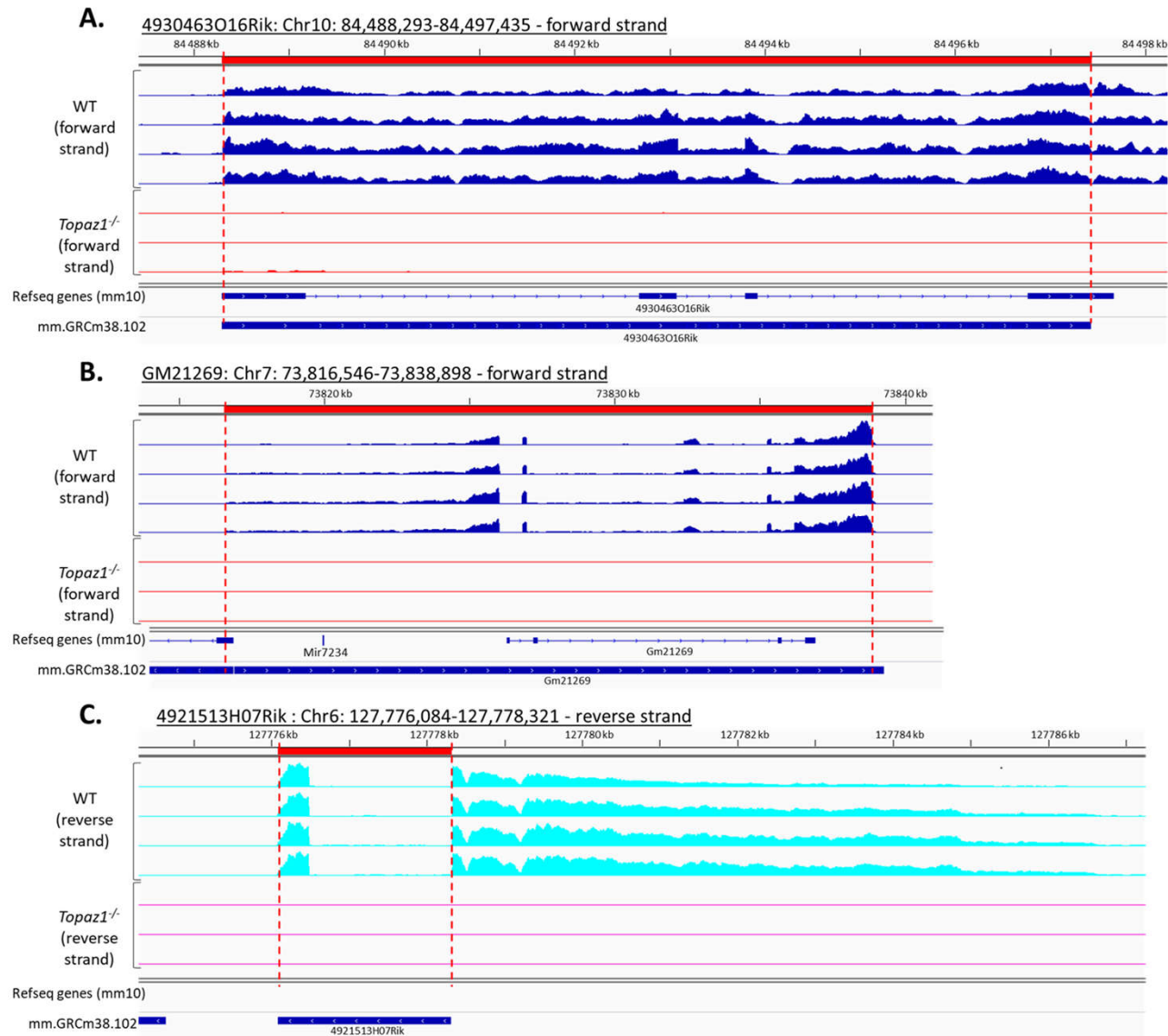
B.



Supplementary Figure 3. Reprogonomic data on the dynamic expression of *4930463O16Rik*. The dynamic expression of *4930463O16Rik* in five different tissues from male and female adult mice (**A**), and in embryonic primordial germ cells and adult male germ cells (**B**). *4930463O16Rik* is expressed in testes in germ cells during post-natal life. The strongest dynamic expression is found in pachytene spermatocytes.

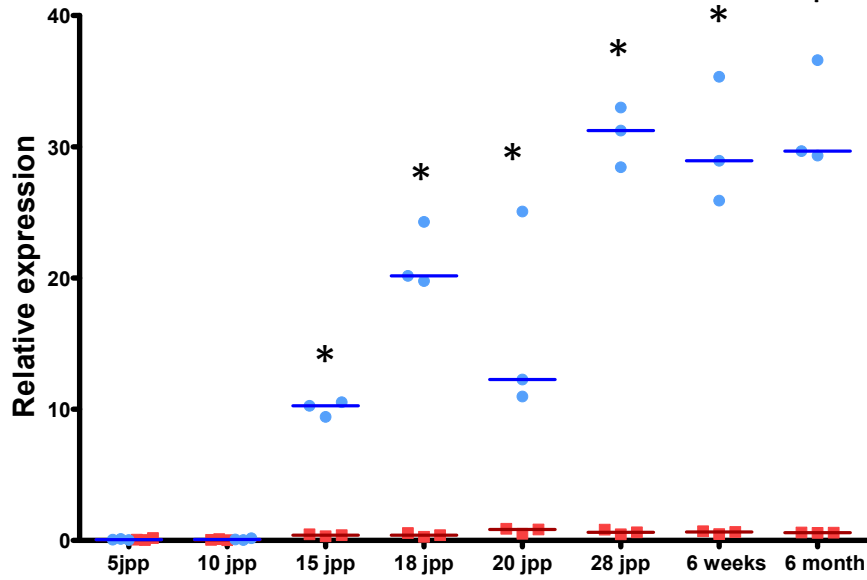
A.**Dynamic expression of Gm21269****B.**

Supplementary Figure 4. Reprogonomic data on the dynamic expression of *Gm21269*. The dynamic expression of *Gm21269* in five different tissues from male and female adult mice (**A**), in embryonic primordial germ cells and adult male germ cells (**B**). *Gm21269* is expressed in testes in germ cells during post-natal life. The strongest dynamic expression is found in pachytene spermatocytes.

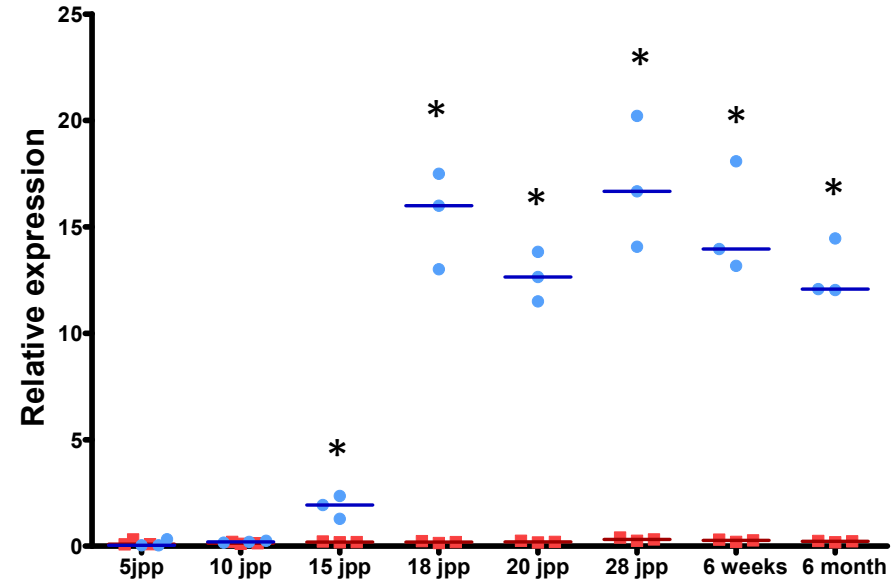


Supplementary Figure 5. IGV representation of P18-testis RNA-seq. Expression of *4930463O16Rik* (A), *Gm21269* (B) and *4921513H07Rik* (C) from BigWig files of strand-specific RNA-seq data. The first four tracks represent transcripts of WT testes at P18; the next three tracks represent transcripts of *Topaz1*^{-/-} testes at the same developmental stage. Representations of the genes (from mm10 or GRCm38) are shown at the bottom of each graph. A representation of the size of *4930463O16Rik* (A), *Gm21269* (B) and *4921513H07Rik* (C) transcripts (red) from Ensembl data (GRCm38) is shown at the top. *4930463O16Rik* and *4921513H07Rik* gene transcriptions overlap in 3' or 5', respectively.

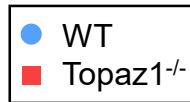
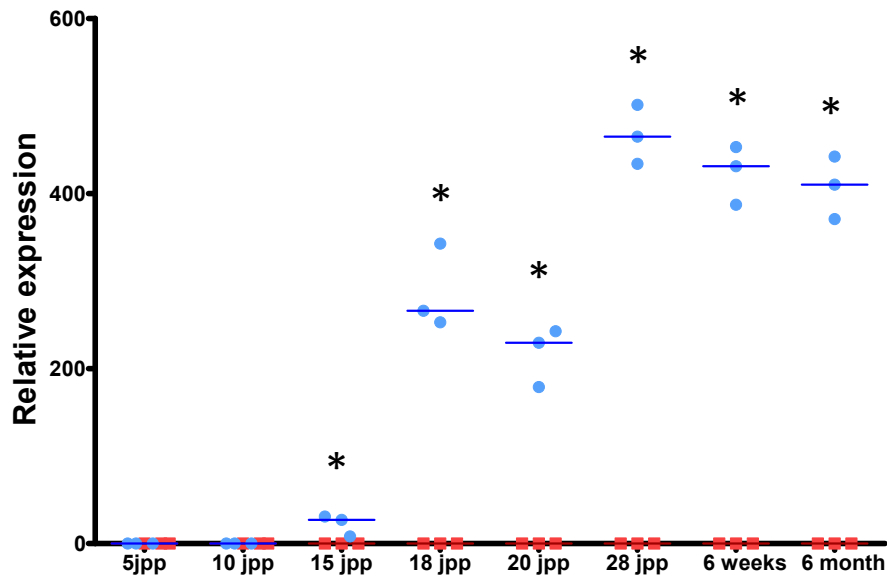
4930463O16Rik



Gm21269



4921513H07Rik

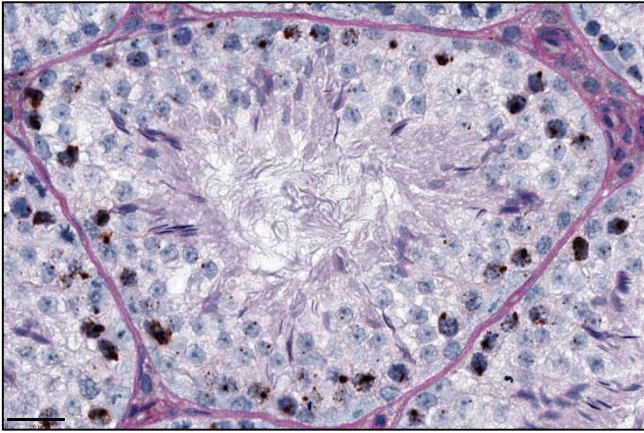


Supplementary Figure 6. Expression of *Gm21269*, *4930463O16Rik* and *492151H07Rik* mRNAs in testes from 5 days to adulthood. Quantitative RT-PCR analysis of *Gm21269*, *4930463O16Rik* and *492151H07Rik* gene expressions at different developmental stages in WT (blue) and *Topaz1*^{-/-} (red) testes. The lines represent the median of each genotype. A Kruskal-Wallis statistical test was performed (*p<0.05; **p<0.01).

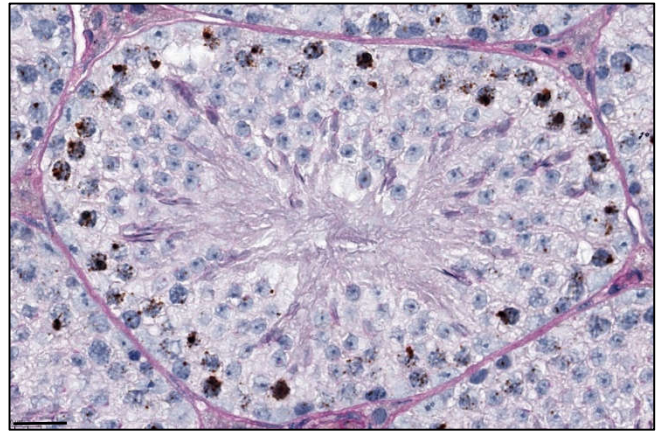
A.

4930463O16Rik

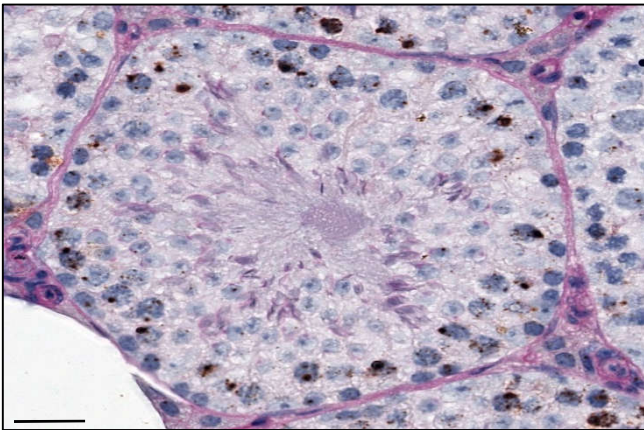
Stage I



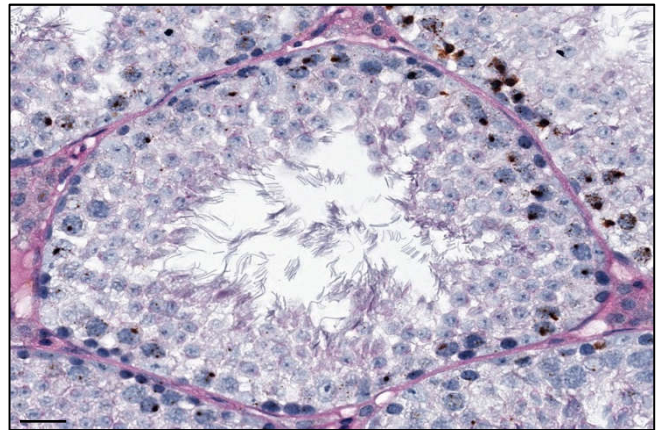
Stage II-III



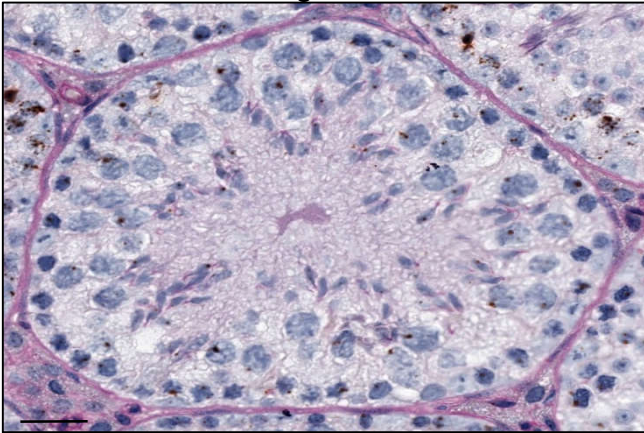
Stage IV-VI



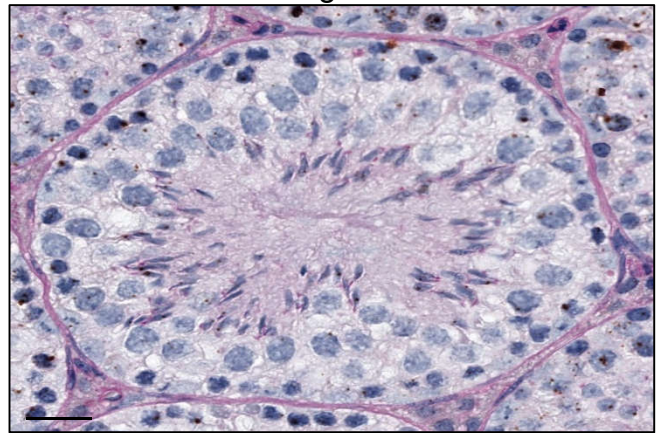
Stage VII-VIII



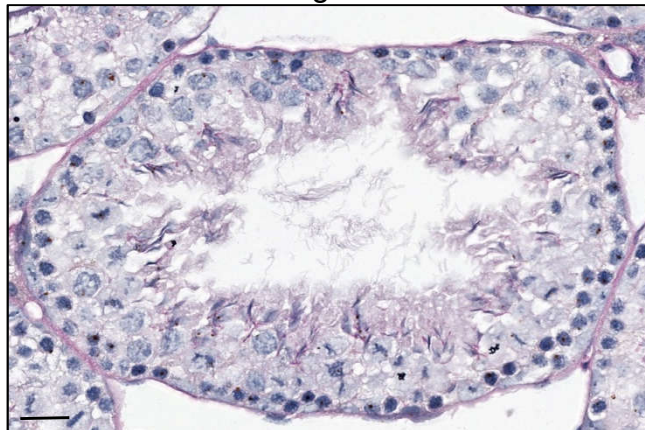
Stage IX-X



Stage XI



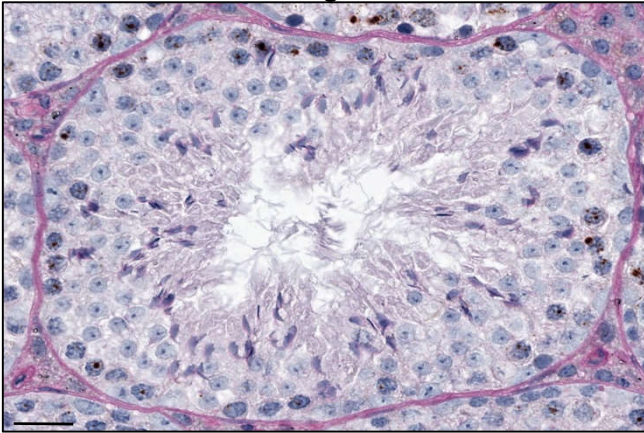
Stage XII



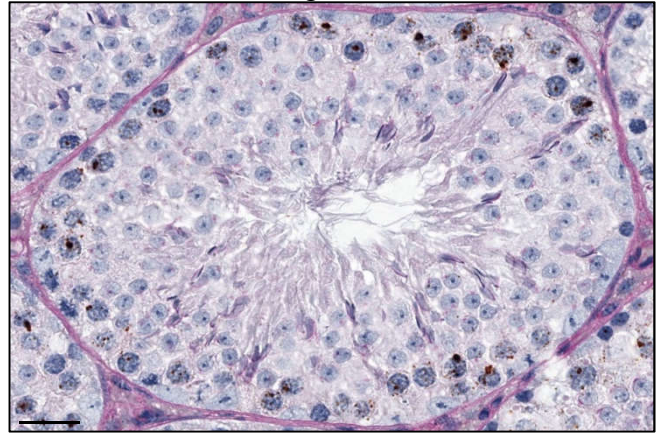
B.

Gm21269

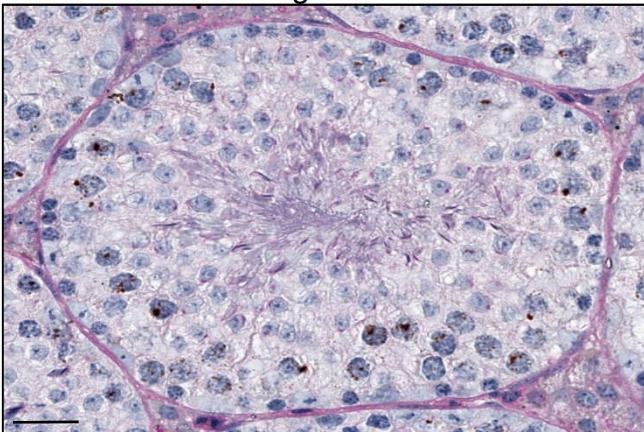
Stage I



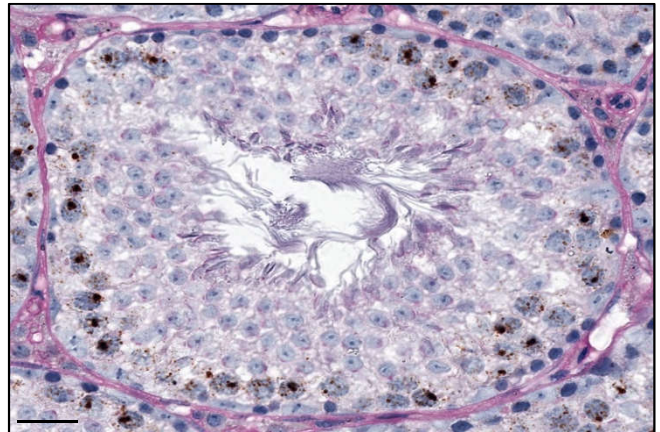
Stage II-III



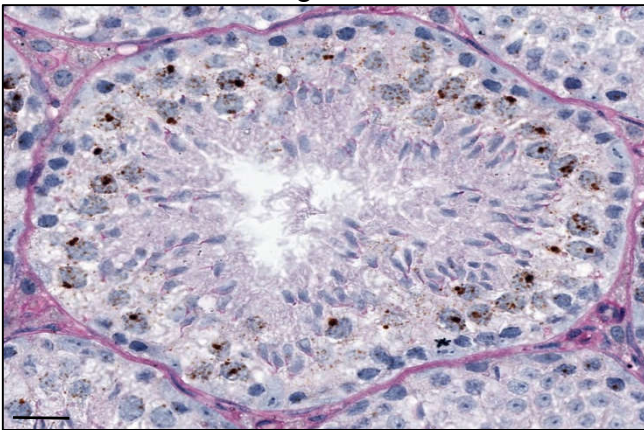
Stage IV-VI



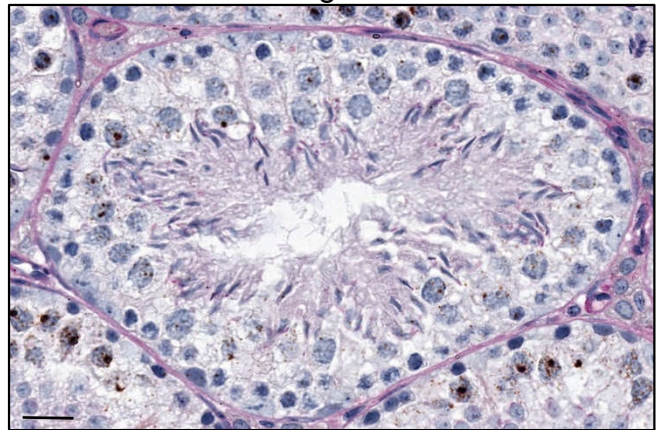
Stage VII-VIII



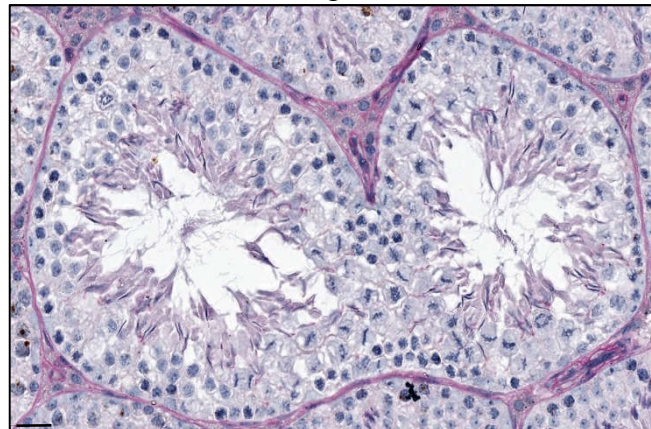
Stage IX-X



Stage XI

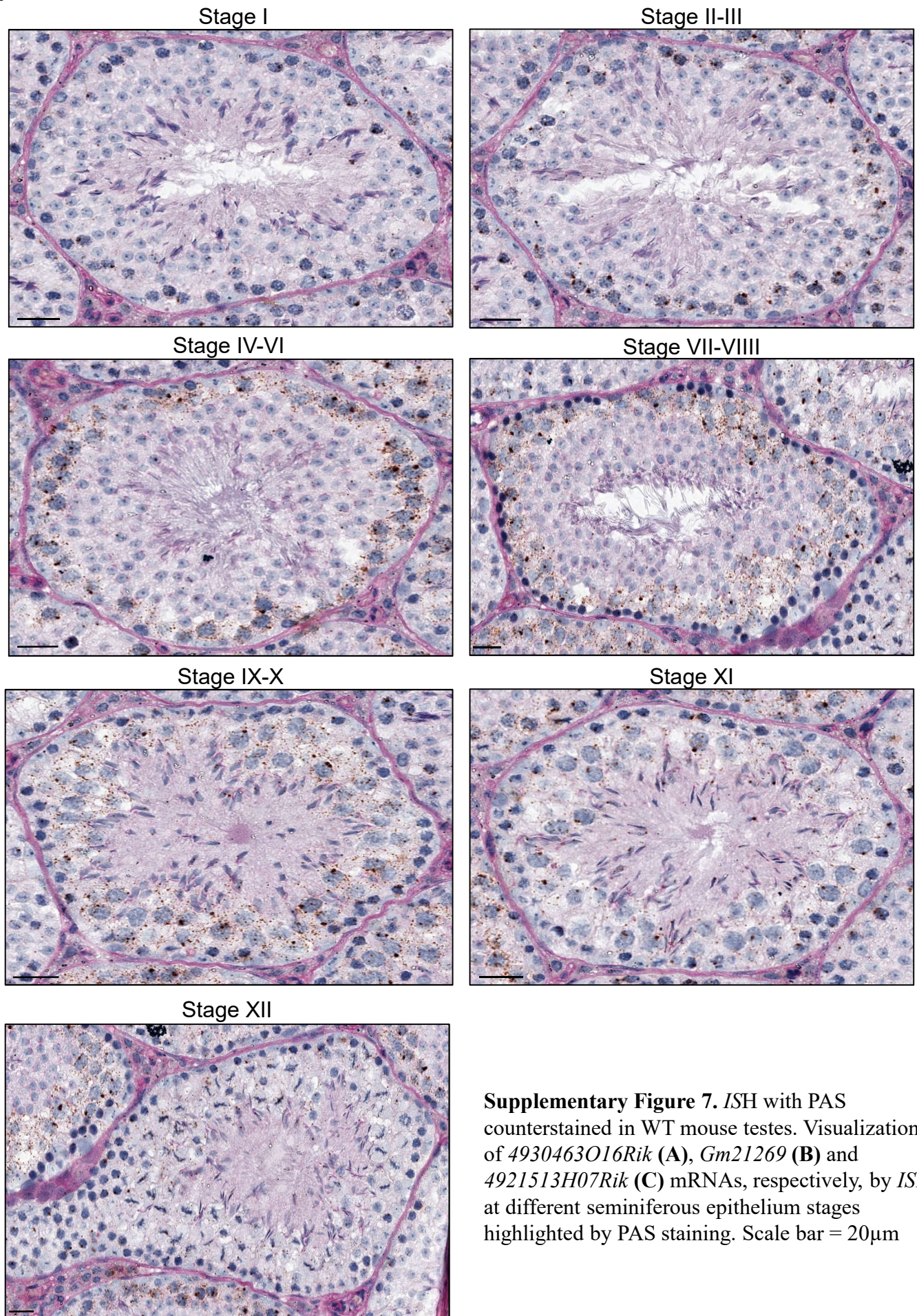


Stage XII

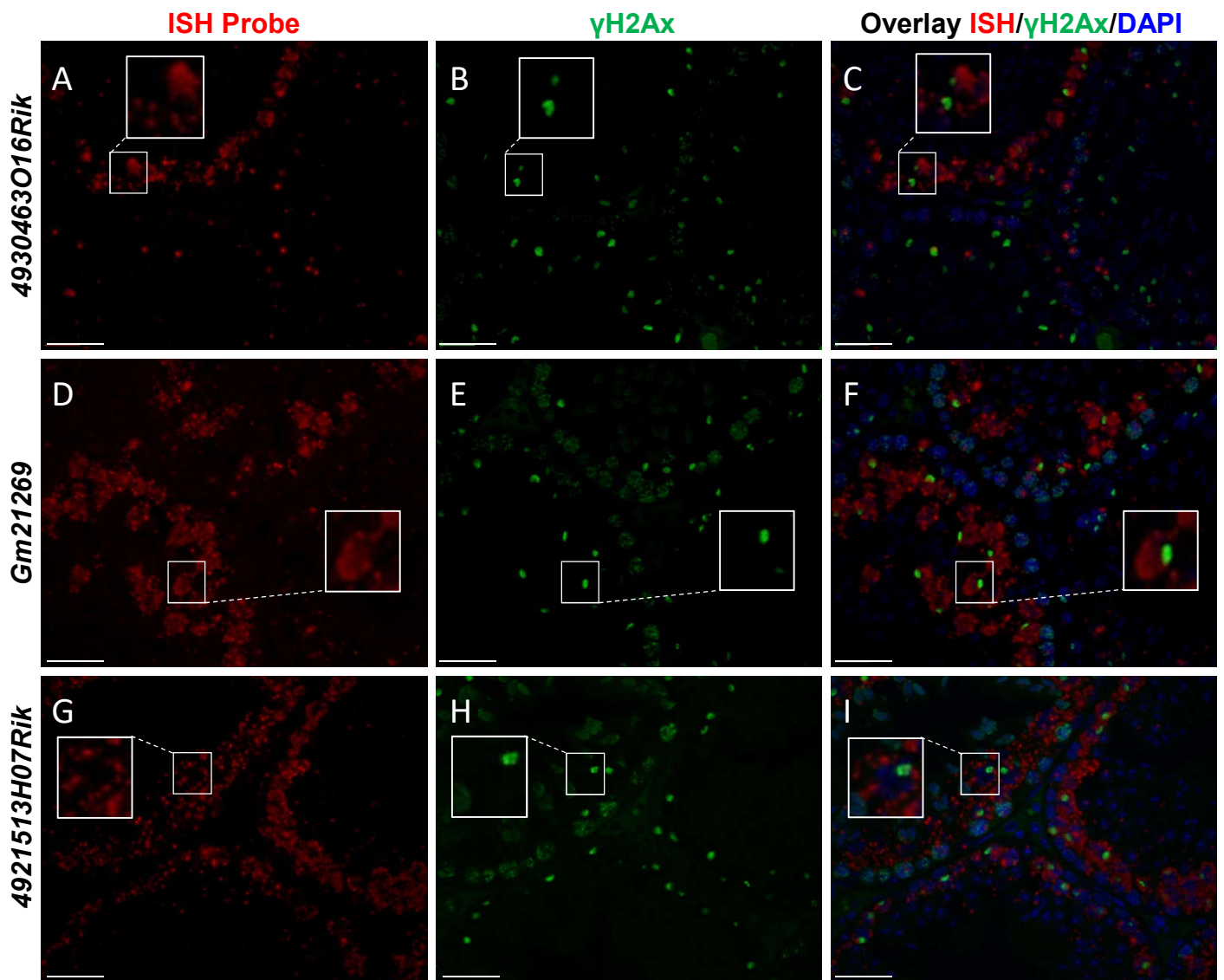


C.

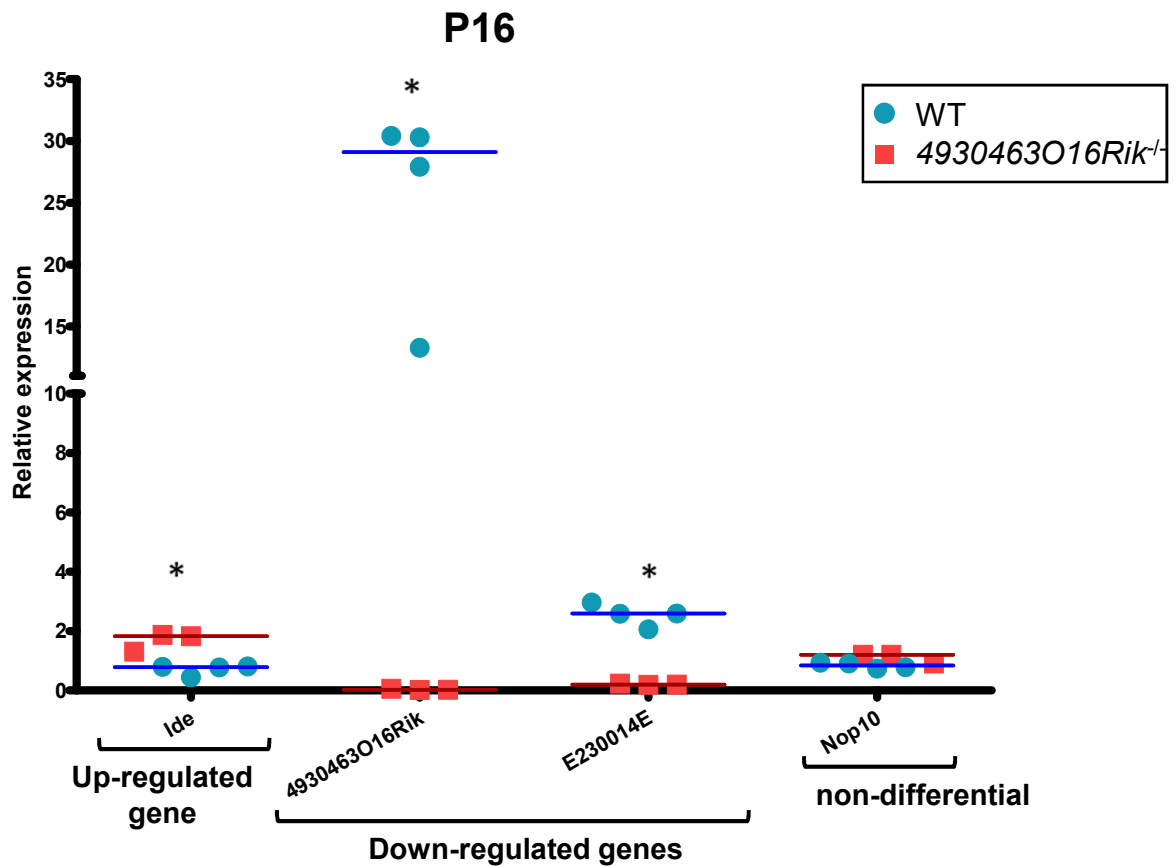
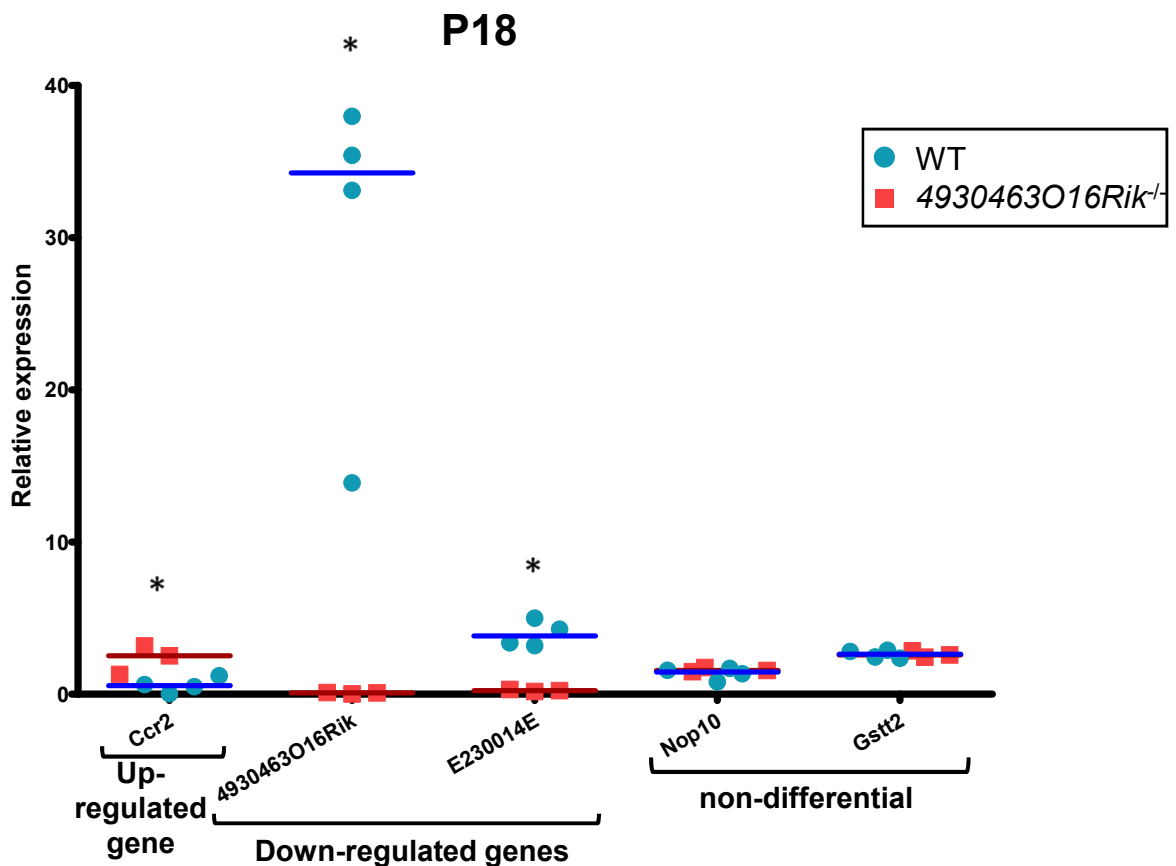
4921513H07Rik



Supplementary Figure 7. ISH with PAS counterstained in WT mouse testes. Visualization of 4930463O16Rik (A), Gm21269 (B) and 4921513H07Rik (C) mRNAs, respectively, by ISH at different seminiferous epithelium stages highlighted by PAS staining. Scale bar = 20µm



Supplementary Figure 8. LncRNA cellular localizations in testes from two month-old WT mice. *ISH* using (A) *4930463O16Rik*, (D) *Gm21269* and (G) *4921513H07Rik* probes (red). (B-E-H) Immunofluorescence staining with γ H2Ax antibody was performed at the same stage of seminiferous epithelium to identify male germ cells (green). (C-F-I) DAPI (blue), visualizing nuclear chromosomes, was merged with *ISH* (green) and IF (red) signals. Zooms in white squares show spermatocytes during prophase I. No colocalization between the sex body (γ H2Ax) and lncRNAs (red) was evident. Scale bar = 20 μ m.

A.**B.**

Supplementary Figure 9. Validation of several DEGs by RT-qPCR (RNA-seq 4930463O16Rik^{-/-} vs WT testes). Validation of several differentially expressed up- or down-regulated genes and of non-DEGs of RNA-seq analysis by RT-qPCR from P16 (A) or P18 (B) mouse testis RNAs. The lines represent the median of each genotype (blue: WT; red: 4930463O16Rik^{-/-}). A Kruskal-Wallis statistical test was performed (*p<0.05).

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Les souris *Topaz1^{+/-}* ont un phénotype normal (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015). Des souris *Topaz1^{+/-}* et WT ont donc été utilisées indifféremment comme témoins d'expérimentation dans les travaux présentés ci-dessous. Leur génotype sera toutefois systématiquement indiqué.

I. Caractérisation de perturbations dans le déroulement de la méiose chez les souris *Topaz1^{-/-}*

Précédemment, nous avons montré que l'architecture de la plaque de métaphase et du fuseau de microtubules était perturbée dans les spermatocytes de souris *Topaz1^{-/-}*. Le marquage α -tubuline a montré un réseau unique de microtubules, centré dans la cellule avec des prolongements vers la périphérie cellulaire, s'apparentant à une sorte d'hémi-fuseau. Avec le marquage γ -tubuline, on observe une duplication des centrosomes mais leur migration ne semble pas effective. Cet ensemble montre donc une forte perturbation du réseau de microtubules et des centrosomes dans les spermatocytes entraînant un arrêt méiotique.

Nous avons alors recherché si d'autres éléments du fuseau métaphasique nécessaires à la division méiotique pouvaient être perturbés dans ces cellules germinales mutantes.

A. Les protéines du kinétochore et du complexe de cohésines

Les anomalies d'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique peuvent être entraînées par des défauts de mise en place des protéines localisées au niveau des kinétochores. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans l'accrochage des microtubules aux centromères, et sont donc nécessaires pour une ségrégation correcte des chromosomes (**voir partie Introduction.II.B.2.a.vi**). Nous avons donc comparé par immunofluorescence la localisation de plusieurs de ces protéines essentielles du kinétochore. Des spermatocytes de souris *Topaz1^{+/-}* et *Topaz1^{-/-}* âgées de 28 *jpp* ont ainsi été analysés et comparés. Des étalements chromosomiques ont été effectués car cette approche permet une meilleure détection de ces protéines en fonction du stade de développement de la cellule germinale. Le marquage de la protéine SYCP3 permet d'ailleurs l'identification des stades de méiose des cellules germinales (élément central du complexe synaptonémal) (**Figure 45**).

Nous avons donc fait des colocalisations de la protéine SYCP3 avec différentes protéines:

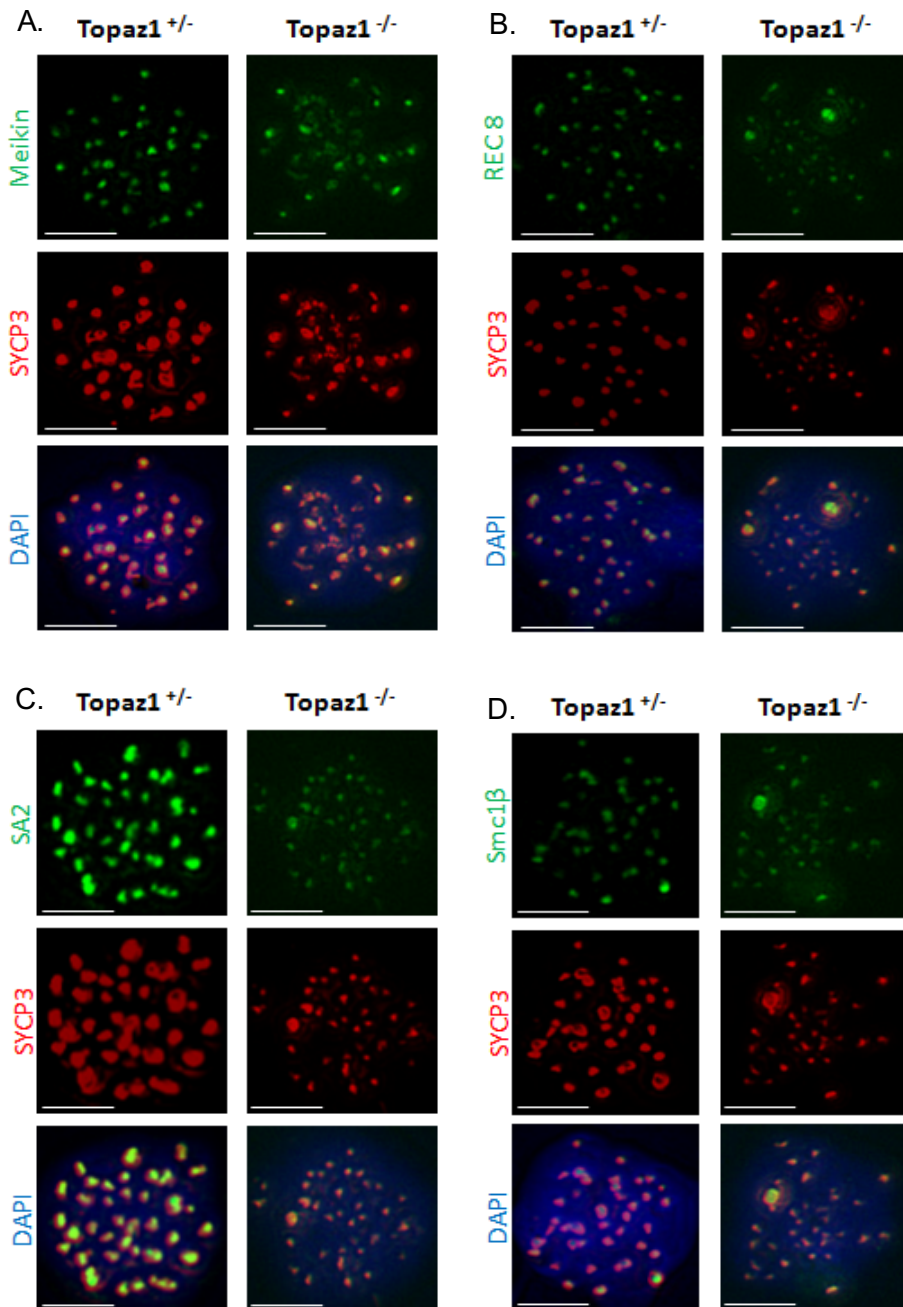


Figure 45 : Double immunomarquage sur étalements chromosomiques de spermatocytes I.

Les observations sont réalisées sur des spermatocytes I provenant de testicules de souris *Topaz1*^{+/-} et *Topaz1*^{-/-} âgés de 28 *jpp*. Les spermatocytes présentés sont au stade de pro-métaphase ou "pro-metaphase like" selon les génotypes. Les protéines MEIKIN (A), Rec8 (B), SA2 (C) et Smc1β (D) sont observées en vert et SYCP3 en rouge. L'ADN est révélé par une coloration DAPI en bleu. Echelle = 10 μm.

- MEIKIN : localisée au niveau du kinétochore, elle est spécifique de la première division de méiose (Kim *et al.*, 2015 ; **partie Introduction.II.B.2.a.vi**),
- Cohésine ubiquitaire (retrouvée en méiose et mitose): SA2,
- Cohésines spécifiques de la méiose avec SMC1 β et REC8 (**partie Introduction.II.B.2.a.i**).

Ces protéines du complexe de cohésines ne participent pas à la formation des kinétochores mais maintiennent l'intégrité des structures pour assurer la ségrégation correcte des chromosomes.

Dans un premier temps, le marquage SYCP3, sur les étalements chromosomiques de spermatocytes de souris WT, nous a permis de réaliser une "échelle" du développement de ces cellules pour nous permettre de repérer facilement le stade de pro-métaphase. En effet, à ce stade, lorsque les chromosomes homologues se dissocient, SYCP3 disparaît en persistant tout de même au niveau des centromères (Parra *et al.*, 2004). Les spermatocytes *Topaz1*^{-/-} étant bloqués avant la division, un marquage SYCP3 spécifique du stade de pro-métaphase n'est donc pas tout à fait le même que celui obtenu chez des animaux WT ou *Topaz1*^{+/-}. Nous avons donc recherché les étalements chromosomiques présentant des stades le plus proches de pro-métaphase (que nous avons appelés « pro-métaphase-like »). Nos résultats montrent qu'à partir d'animaux *Topaz1*^{+/-}, les protéines MEIKIN, SA2, SMC1 β et REC8 présentent un marquage ponctiforme colocalisé avec le marquage SYCP3, ces protéines sont localisées au niveau des centromères lors de la métaphase de méiose I. Dans les spermatocytes *Topaz1*^{-/-} au stade "pro-metaphase-like", le marquage des protéines MEIKIN, SA2, SMC1 β et REC8 sont exprimées et co-localisées avec le marquage SYCP3 (**Figure 45**). L'absence de *Topaz1* n'affecte pas la localisation de ces protéines lors de la fin de prophase I de méiose.

B. Visualisation des centrioles par MET.

Dans le but de vérifier si l'organisation des centrosomes est affectée en absence de *Topaz1*, nous avons tenté de localiser les centrioles directement dans les spermatocytes WT et *Topaz1*^{-/-} en utilisant de la microscopie électronique à transmission (M.E.T) (plateforme MIMA 2, INRAE, Jouy-en-Josas). Afin d'optimiser les chances d'observer des cellules germinales en fin de prophase I-début de métaphase, des testicules de souris de 28 *jpp* (première vague de la spermatogenèse) ont été utilisés afin de s'affranchir de la présence d'un grand nombre de spermatozoïdes.

Lors de la transition de prophase I – métaphase I, le MTOC / centrosome est composé d'un doublet de centrioles entouré du matériel péri-centriolaire. Ce MTOC est située à la périphérie cellulaire (**partie Introduction.II.C.1**). Cette structure a été mise en évidence dans les spermatocytes de souris WT (**Figure 46**). Actuellement, dans les spermatocytes *Topaz1*^{-/-}, aucune structure rappelant les centrioles n'a pu être observée. Suite à ces résultats, nous avons proposé deux hypothèses :

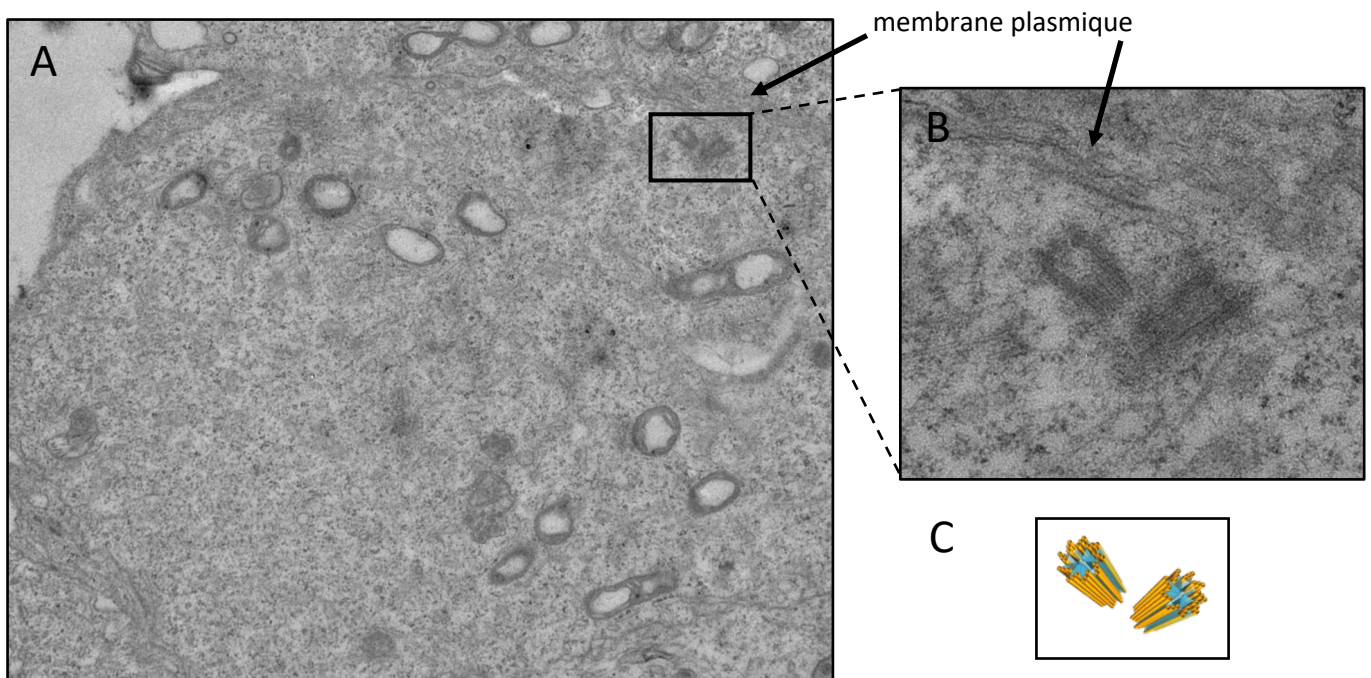


Figure 46 : Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de spermatocyte WT.

Les images ont été obtenues à partir d'un testicule de souris WT âgé de 28 jpp. **(A)** Agrandissement à x3,0k d'un spermatocyte I en pro-métaphase ou métaphase. **(B)** Agrandissement d'une paire de centrioles à x15,0k. **(C)** Représentation schématique de cette paire de centrioles.

- Bien que les centrioles se dupliquent dans les spermatocytes Topaz1^{-/-} (attesté par le marquage anti γ -tubuline), les centrosomes ne se forment pas correctement et l'observation en microscopie électronique n'a pas permis de les identifier
- Les centrosomes sont bien formés chez les individus Topaz1^{-/-} mais ils n'ont pas pu être identifiés pour le moment dans les spermatocytes observés (difficulté d'observation en fonction de l'angle de la coupe par exemple).

L'ultrastructure des centrosomes/centrioles dans les spermatocytes Topaz1^{-/-} n'a pas encore été mise en évidence à ce jour.

II. Création d'une protéine Topaz1-Flag.

Les travaux antérieurs de Luangpraseuth-Prosper *et al* (2015) avaient confirmé par *HIS* la localisation des ARNs messagers du gène Topaz1 dans les cellules germinales de souris. Cependant, la caractérisation de la protéine TOPAZ1 en immunohistologie, ou par des analyses biochimiques globales (de type Western blot) n'a pas pu être mise en place suite à l'absence d'anticorps capable de reconnaître spécifiquement la protéine. Or, cette localisation est aussi importante pour mieux comprendre le rôle de TOPAZ1. Nos échecs répétés dans les tentatives de production d'un anticorps spécifiques (et différents échecs commerciaux puisque désormais certaines compagnies proposent un anticorps anti-TOPAZ1) nous ont conduits à tenter une autre stratégie. Nous avons ainsi décidé de produire un gène chimère permettant la synthèse d'une protéine recombinante TOPAZ1 fusionnée à un motif protéique de courte longueur (motif FLAG) facile à détecter par un anticorps efficace du commerce. Il devrait alors être possible de localiser la protéine TOPAZ1-FLAG, et même éventuellement de tenter, par exemple, une immunopurification.

Deux stratégies ont été mises en œuvre :

- Production de souris mutantes génétiquement modifiées chez lesquelles le motif FLAG devait être ajouté dans le gène Topaz1 en position C- ou N-terminale à la faveur de la technologie de « genome editing » ; travaux faits en collaboration avec l'équipe MoDiT – GABI (INRAE, Jouy-en-Josas).
- Production de cellules en culture, génétiquement modifiées par l'intégration d'un gène chimère TOPAZ1-FLAG ; ce gène chimère devant être construit à partir du gène Topaz1 de souris cloné dans un BAC (pour Bacterial Artificial Chromosome).

L'obtention de souris mutantes Topaz1-FLAG est en cours. Il s'agit de provoquer l'intégration d'un motif FLAG à la faveur d'une recombinaison homologue dans des embryons de souris. La stratégie de « genome editing » utilisée consiste à injecter simultanément dans l'embryon unicellulaire un petit ARN spécifique de la région ciblée (sgARN), la nucléase Cas9 et un fragment d'ADN simple brin de courte longueur. Ce fragment d'ADN comprend la séquence nucléotidique du FLAG, flanquée de deux courtes régions de séquences homologues à celles de part et d'autre du point ciblé par la mutation. Le complexe qui se forme spontanément entre Cas9 et sgARN se localise rapidement sur le site du génome déterminé par la séquence du sgARN. L'activité endonucléase de la Cas9 provoque la coupure de l'ADN du génome au point de fixation. Le fragment d'ADN peut alors s'intégrer par un mécanisme de recombinaison homologue favorisé par la coupure de l'ADN. Une fois la microinjection achevée, les embryons sont immédiatement transférés dans les voies génitales d'une souris receveuse hormonalemement préparée pour une gestation. Actuellement, aucune souris portant la mutation n'a encore été identifiée. Des expérimentations sont toujours en cours.

Mon travail durant ma thèse a consisté à mettre en œuvre la seconde stratégie c'est à dire:

- Construire le gène chimère Topaz1-Flag. Le gène *Topaz1* étant très long (environ 5000 paires de bases), il était impossible d'intégrer la séquence FLAG par les méthodes traditionnelles de coupure par enzymes de restriction et ligation. Nous avons donc provoqué l'intégration de la séquence FLAG par recombinaison homologue dans le gène cible Topaz1 cloné dans un BAC. La technique utilisée est celle commercialisée par GeneBridges (Heidelberg, Allemagne) (Kit RedET).
- Rechercher les ARN messagers et les protéines dans des cellules transfectées par le gène chimère Topaz1-Flag.

A. Obtention d'un BAC contenant la totalité du gène Topaz1 de souris.

Un BAC (que nous appellerons BAC-Topaz1) contenant un fragment du chromosome 9 murin incluant le gène Topaz1 a été identifié dans la base de données Ensembl, puis a été obtenu auprès de CHORI (<https://www.sourcebioscience.com> ;bMQ Mouse BAC Library). Le séquençage des bordures du fragment de génome cloné dans ce BAC a été effectué par Eurofins (Lidköping, Suède) à partir d'amorces spécifiques (SP6 et T7) choisies dans le vecteur de clonage (pBACs3.6) à proximité immédiate du site d'enzyme de restriction utilisé pour l'intégration du fragment de génome (site BamHI) (**Figure 47**).

Ainsi nous avons déterminé que le fragment intégré d'environ 158kb (chr9 :122710744-122751238, Ensembl release 102) contient l'intégralité des gènes *Gm47137*, *Topaz1* et *Tcaim* (**Figure 47**).

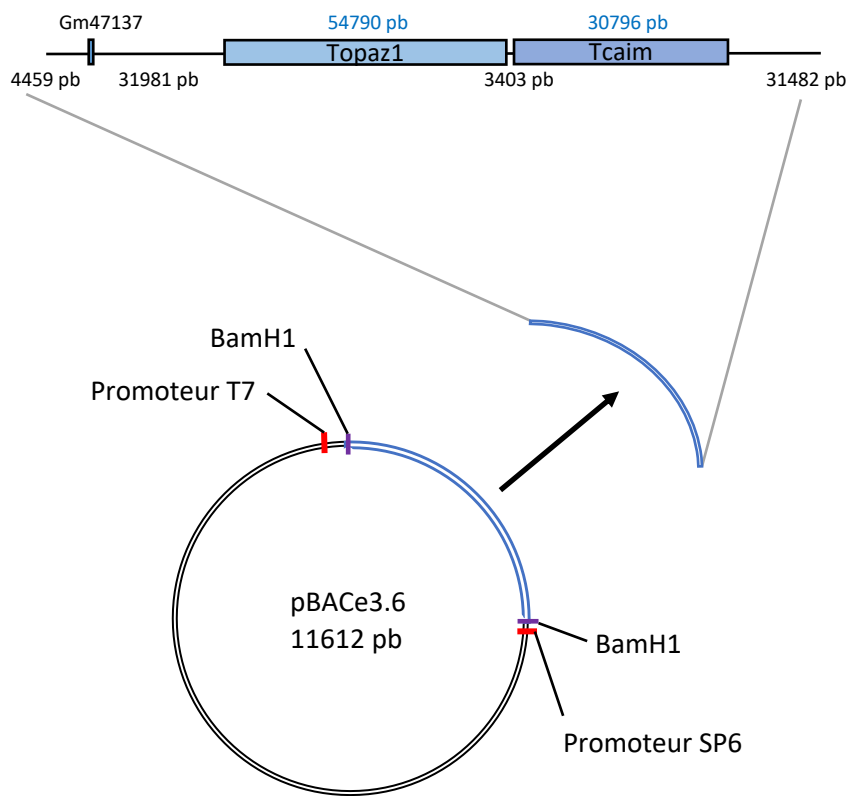


Figure 47 : Représentation schématique de la séquence ADN du BAC-Topaz1.

B. Validation du BAC-Topaz1 comme source de production de Topaz1 en cellules en culture.

Il était nécessaire de savoir si le fragment de génome cloné dans le BAC-Topaz1 pouvait être à l'origine de l'expression du gène Topaz1. Des cellules CHO.K1 (lignée de cellules immortalisées, issues d'ovaire de Hamster) ont été utilisées comme matériel vivant pour exprimer les gènes du BAC-Topaz1. L'ADN de ce BAC-Topaz1 a été introduit par transfection dans ces cellules. L'expression des gènes du BAC a été analysée par RT-qPCR deux jours après, c'est-à-dire pendant la période d'expression transitoire des gènes introduits. Les analyses ont montré que *Topaz1* et *Tcaim* ne sont pas exprimés dans les cellules CHO.K1 non transfectées (contrôle négatif) (**Figure 48**). Lorsque l'ADN BAC-Topaz1 est transfecté dans les cellules CHO.K1, les gènes *Tcaim* et *Topaz1* sont exprimés significativement (**Figure 48**). Ainsi, le BAC-Topaz1 contient tous les éléments nécessaires pour que le gène *Topaz1* soit exprimé dans des cellules de lignée CHO.K1. Comme nous l'avons déjà signalé, nous n'avons pas d'anticorps capable de détecter la protéine TOPAZ1. Nous ne pouvons donc pas conclure que le transcrit *Topaz1* est traduit en protéine dans ces cellules.

C. Introduction de la séquence FLAG en position C-terminale de la protéine TOPAZ1

Par recombinaison homologue nous avons introduit la séquence codante pour 3 domaines FLAG associés (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK) immédiatement en amont du codon stop TAG dans l'exon 20 du gène Topaz1 en suivant le protocole de recombinaison homologue en bactéries adapté du kit RedET (GeneBridges). Pour cela, un fragment d'ADN a été synthétisé (Eurofins). Ce fragment long de 1052 pb comprend des séquences homologues au gène Topaz1 au niveau du site d'intégration choisi (50 pb en 3' et en 5'), une séquence codant pour le gène de résistance à la kanamycine entouré de deux sites de restrictions et la séquence codante pour la cassette FLAG (**Figure 49**). Les séquences homologues sont responsables de la recombinaison homologue au site choisi. La résistance à la kanamycine permet de sélectionner les bactéries qui possèdent le BAC-Topaz1 et qui ont intégré la construction FLAG par recombinaison homologue. Une fois que nous avons obtenu les bactéries recombinantes, le gène de résistance à la kanamycine a été supprimé par digestion enzymatique et ligation. Le nouveau BAC obtenu est alors appelé le BAC-Topaz1-Flag.

Il était nécessaire de vérifier que ces manipulations au sein du BAC n'avaient pas provoqué d'autres mutations non désirées dans le fragment de génome de souris. Dans ce but, chaque exon du BAC-Topaz1-Flag a été amplifié par PCR et séquencé (**Figure 50**). La taille et la séquence de chaque amplicon a été comparée à celle des amplicons obtenus à partir du génome de souris. Aucune mutation

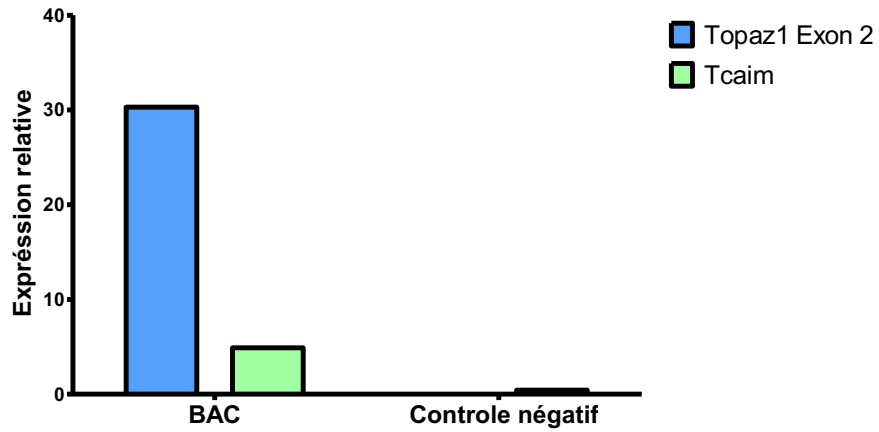
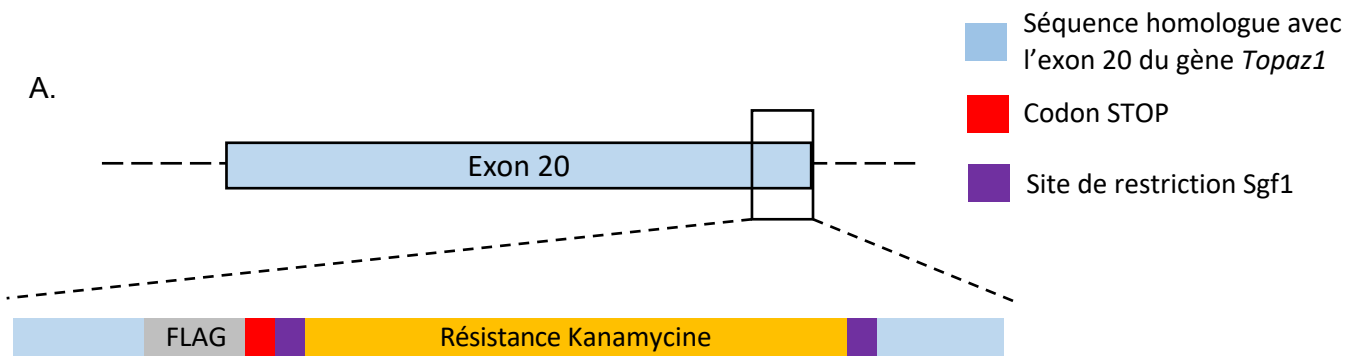


Figure 48 : Expression relative des transcrits *Topaz1* et *Tcaim* dans les cellules CHO.K1.

Histogramme représentant l'expression relative des transcrits *Topaz1* et *Tcaim* dans les cellules CHO.K1 non transfectées (contrôle négatif) ou transfectées avec le BAC-*Topaz1*. Le gène de référence utilisé est *Gapdh* (non représenté).



B.

TGAAAGAGAATATGAAGTGGGCTGGAAAGGTTGGCTTTTCACTAACCATGACTACAAGGACGACGACGATAAGTA
 CcgatcgcAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAA
 ACCATGGGTAGCGCAATTGAACAGGATGGTCTGCATGCAGGTAGTCCGGCAGCATGGGTTGAACGTCTGTTTGGTT
 ATGATTGGGCACAGCAGACCATTGGTTGTAGTGATGCAGCAGTTTTTCGTCTGAGCGCACAGGGTCGTCCGGTTCT
 GTTTGTTAAACCAGTCTGAGCGGTGCACTGAATGAACTGCAGGATGAAGCAGCACGTCTGAGCTGGCTGGCAACC
 ACCGGTGTCCGTGTGCAGCAGTTCTGGATGTTGTTACCGAAGCAGGTCGTGATTGGCTGCTGCTGGGTGAAGTTC
 CGGGTCAGGATCTGCTGAGCAGCCATCTGGCACCGGCAGAAAAAGTTAGCATTATGGCAGATGCAATGCGTCTGCT
 GCATACCCTGGATCCGGCAACCTGTCCGTTTGATCATCAGGCAAAACATCGTATTGAACGTGCACGTACCCGTATGG
 AAGCAGGTCTGGTTGATCAGGATGATCTGGATGAAGAACATCAGGGTGAACGTGTTGACAGTCTGAAAGCACGTAT
 GCCGGATGGTGAAGATCTGGTTGTTACCCATGGTGTATGCATGTCTGCCGAATATTATGGTTGAAAATGGTCGCTTTA
 GCGGCTTTATTGATTGTGGTCGTCTGGGTGTTGCAGATCGTTATCAGGATATTGCACTGGCAACCCGTGATATTGCC
 GAAGAACTGGGTGGTGAATGGGCAGATCGTTTTCTGGTTCTGTATGGTATTGCAGCACCGGATAGCCAGCGTATTG
 CTTTTATCGTCTGCTGGATGAATTTTTTAAGCGGGACTCTGGGGTTCGAATAAAGACCGACCAAGCGACGTCTGg
 cgatcgcTAAAGGGTGTGTTGCATTTTCTTTTTAAGTTCAAATAATCATTGTTGA

Figure 49 : Fragment de recombinaison homologue.

(A) Schéma du fragment de recombinaison. (B) Séquence nucléotidique du fragment de recombinaison.

indésirable n'a été observée. L'addition de la cassette FLAG a été confirmée exactement comme attendue dans l'exon 20.

D. Expression du gène chimère Topaz1-FLAG dans des cellules en culture après transfection

Après transfection, l'expression du transcrite Topaz1-FLAG a été mise en évidence par RT-qPCR : les transcrits *Topaz1* et *Tcaim* sont détectés seulement dans les cellules transfectées avec le BAC-Topaz1-Flag (**Figure 51A**). Les cellules non transfectées (témoins négatif), n'expriment aucun des transcrits. L'expression de *Topaz1* a également été mise en évidence par *HIS* sur les cellules transfectées (**Figure 51B**). Le transcrite *Topaz1* n'est observé que dans quelques cellules, suggérant que le BAC est transfecté avec une faible efficacité dans les cellules CHO.K1.

E. Mise en évidence d'une protéine traduite à partir du BAC-Topaz1-FLAG

La présence d'une protéine possédant le motif FLAG a été recherchée dans les cellules CHO.K1 transfectées par le BAC Topaz1-FLAG. Malgré la détection par RT-qPCR dans ces cellules d'un ARNm contenant la séquence correspondant à ce motif, aucun signal positif n'a pu être observé par immunofluorescence sur les cellules fixées au PAF en utilisant l'anticorps anti FLAG du commerce (clone M2, monoclonal souris) (**Figure 52**). Pourtant un signal positif a pu être observé dans d'autres cellules CHO transfectées par une construction témoin exprimant le motif FLAG. La **figure 52** montre que 10% des cellules sont positives dans ce dernier cas. L'efficacité de l'anticorps et la qualité des techniques n'est donc pas à mettre en cause. Il faut cependant signaler que l'efficacité de transfection du plasmide témoin utilisé (6525 pb) est très certainement beaucoup plus forte que celle du BAC Topaz1-FLAG (156kb). La très faible efficacité de transfection du BAC est probablement responsable de la faible quantité de protéine produite par les cellules. Cette quantité serait inférieure au seuil de détection de la technique d'immunohistologie. En revanche, le seuil de détection de la technique de qPCR et HIS étant beaucoup plus bas, nous avons pu détecter l'ARN messenger de Topaz1-Flag après transfection.

Nous avons également voulu visualiser la protéine TOPAZ1-Flag par analyse sur gel d'électrophorèse et immunomarquage (technique de WB, Western blot) d'extraits protéiques préparés à partir des cellules CHO.K1 transfectées (**Figure 53A**). Le témoin négatif ainsi que l'extrait de cellules transfectées avec le BAC-Topaz1-FLAG ne présentent aucun marquage, alors que l'extrait de protéines préparées à partir des cellules transfectées par le plasmide témoin FLAG montre un marquage correspondant à une protéine témoin de la taille attendue (environ 50 kDa).

Enfin, pour compenser la faible production éventuelle de la protéine TOPAZ-FLAG dans ce système de cellules transfectées, nous avons cherché à augmenter la concentration des protéines possédant une cassette FLAG par immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps dirigé contre le motif FLAG (**Figure 53B**). Le produit obtenu a été analysé par WB, en utilisant le même anticorps anti FLAG. Seule la construction témoin permet de visualiser un signal positif. Aucun signal spécifique n'est observé dans les extraits protéiques des cellules transfectées avec le BAC Topaz1-Flag. Ainsi, aucune des différentes expérimentations réalisées n'ont permis de mettre en évidence la protéine TOPAZ1-FLAG.

Il est peu probable que l'absence de protéine TOPAZ1-FLAG soit le seul fait d'un défaut de la machinerie de transcription. Comme nous l'avons déjà présenté, le faible niveau d'efficacité de la transfection pourrait être responsable de l'absence de détection.

III. Caractérisation du lncARN 4930463O16Rik

A. Borne exon-intron du lncARN

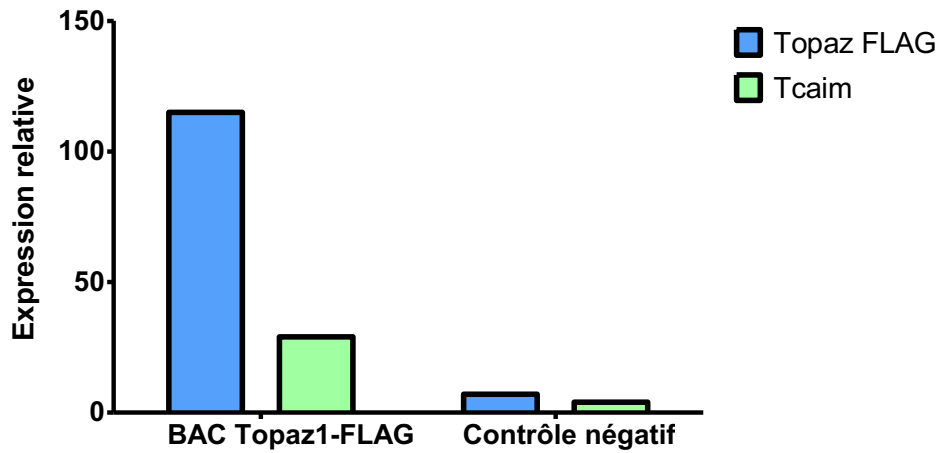
L'étude du lncARN *4930463O16Rik* a commencé par la caractérisation de son gène à savoir vérifier la présence des 4 exons prédits dans les bases de données ainsi que d'éventuels épissages alternatifs. Des RT-PCR ont été réalisées à partir d'ARN issus de testicules de souris adultes WT (**Figure 54**) et les produits de PCR ont été séquencés. L'emploi de couples de primers permettant d'amplifier des exons consécutifs ont permis de conclure que les introns 1, 2 et 3 sont bien épissés comme ce que montre les prédictions des bases de données (**Figure 54B**).

Un produits PCR à une taille inattendu a été observé entre l'exon 2 et 3 (fragment amplifié d'environ 1500 pb) et a été séquencé (**Figure 54B**). Le fragment observé correspond à une amplification de l'exon 2. Ces observations mettent en évidence que le lncARN *4930463O16Rik* présente au moins 2 formes d'ARNs suite à l'épissage alternatif de l'intron 2 dans le testicule de souris.

B. Étude de l'extrémité 3' du lncARN 4930463O16Rik

Les bases de données publiques nous ont permis de mettre en évidence un EST issu d'une banque d'ADNc de testicule adulte de souris (numéro d'accèsion: AK007040 ou 1700092E16Rik; ENSMUSG00000111487) en 3' du lncARN *4930463O16Rik*. La distance qui sépare la fin de l'exon 4 de *4930463O16Rik* et *1700092E16Rik* est inférieure à 1kb. Nous avons émis l'hypothèse que cet EST pourrait partie de l'exon 4 ou former un 5ème exon du lncARN.

A.



B.

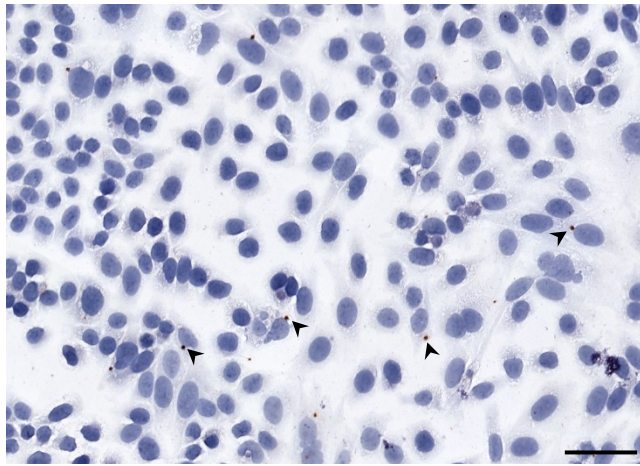


Figure 51 : Transcription des gènes du BAC Topaz1-FLAG dans les cellules CHO.K1.

(A) Histogramme représentant l'expression relative des transcrits *Topaz1* et *Tcaim* transfectés dans les cellules CHO.K1 non transfectées (contrôle négatif) ou transfectés. (B) Visualisation du transcrit *Topaz1* par *HIS* dans les cellules CHO.K1. Echelle = 50 μ m.

Pour vérifier ces hypothèses, des RT-PCR ont été réalisées à partir d'ADNg (ADN génomique) et d'ARN issus de testicules WT. Des couples d'amorces chevauchants ont été répartis de l'extrémité 3' de l'exon 4 jusqu'au gène *1700092E16Rik* (**Figure 55A**). Des amplifications à partir de l'ADNg (témoins positifs) et de l'ADNc sont visibles à partir des 4 couples d'amorces utilisés (**Figure 55B**). Ces résultats mettent en évidence une transcription continue entre l'extrémité 3' de l'exon 4 du lncARN *4930463O16Rik* jusqu'à 158 pb en 3' du gène *1700092E16Rik*. La sous expression du lncARN *4930463O16Rik* semble donc s'étendre jusqu'au transcrit *1700092E16Rik*. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une transcription continue du gène *4930463O16Rik* jusqu'à *1700092E16Rik*.

Ces résultats ont été confirmés par les résultats de RNA-seq présentés dans l'article. Les données obtenues et les représentations sous le visualisateur de génome IGV nous ont permis de confirmer qu'une transcription est continue du lncARN *4930463O16Rik* jusqu'au gène *1700092E16Rik* voire jusqu'à la fin du gène *E230014E18Rik* (décrit comme un lncARN dans Ensembl!) situé à 20 kb du lncARN (**figure 5C de l'article**).

C. Dérégulation de l'expression de Ckap4

A environ 30 kb en 3' du gène *4930463O16Rik* (sur le brin opposé, se trouve le gène *Ckap4* (pour *cytoskeleton-associated protein 4* aussi appelé CLIMP-63, cytoskeleton-linking membrane protein 63). Les résultats des RNA-seq à P18 montrent une sous-expression de *Ckap4* significative (p -val adj<0,05) dans les deux lignées mutantes *Topaz1^{-/-}* et *4930463O16Rik^{-/-}* vs WT (FC= 1,7 dans les deux cas) ce qui pourrait suggérer, notamment pour le lncARN *4930463O16Rik*, une régulation positive sur le gène *Ckap4* (**Figure 56A**). L'absence du gène ou l'absence de transcription de *4930463O16Rik* sur le brin sens semble réguler la transcription de *Ckap4* sur le brin antisens. Un profil de développement testiculaire post-natal de l'expression de *Ckap4* a été réalisé dans les 3 lignées de souris (WT, *Topaz1^{-/-}* et *4930463O16Rik^{-/-}*). Les résultats mettent en évidence une diminution significative de l'expression de *Ckap4* dans les deux lignées de souris mutantes (**Figure 56B**). Ainsi l'absence de transcription de *4930463O16Rik* dans la lignée *Topaz1^{-/-}* et/ou l'absence du gène *4930463O16Rik* dans la lignée *4930463O16Rik^{-/-}* entraîne une diminution de l'expression de *Ckap4*.

Pour information, nous avons également vérifié l'expression de *Nuak1*, gène le plus proche de *4930463O16Rik* situé en 5'. L'expression de ce gène n'est pas différentielle entre testicules de souris normales versus mutantes.

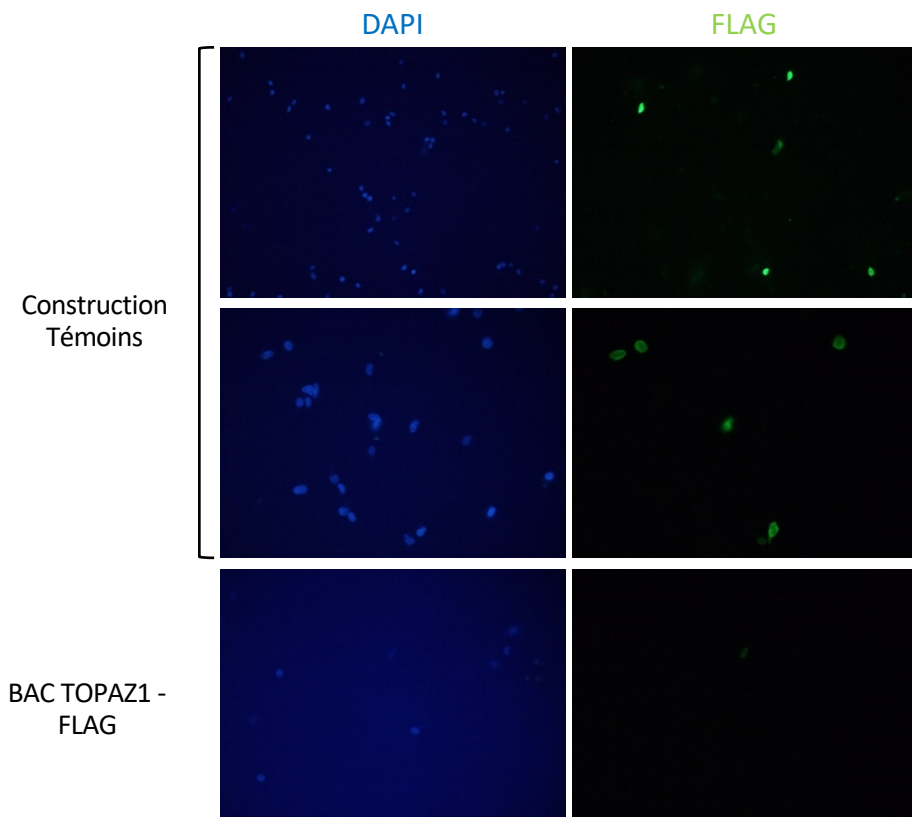


Figure 52 : Immunofluorescence avec l'anticorps anti-FLAG des cellules CHO.K1 transfectées.
 Les cellules observées sont transfectées avec le BAC Topaz1-FLAG ou avec une construction témoin flaguée. L'ADN des cellules est coloré avec du DAPI (Bleu).

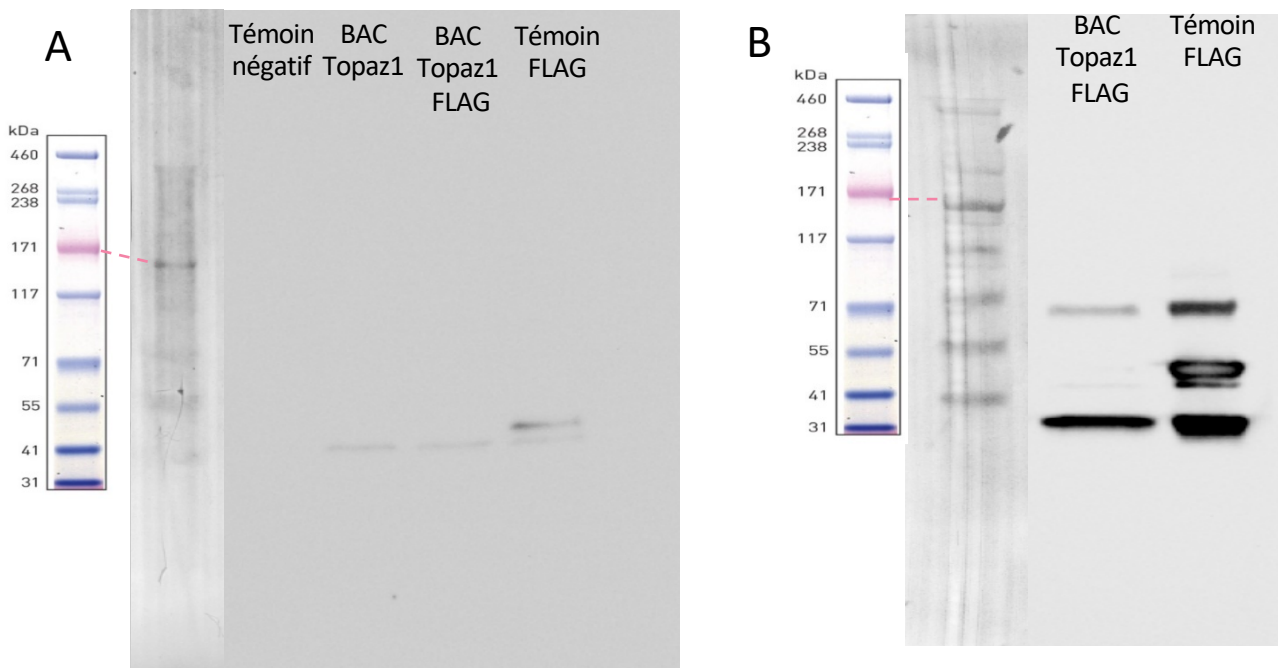


Figure 53 : Western blot dirigé contre la séquence FLAG.

(A) Western blot sur des extraits de protéines totales issues des cellules CHO.K1 non transfectées (témoin négatif), transfectées avec le BAC-Topaz1 sans FLAG, le BAC Topaz1-FLAG ou avec la construction témoin FLAG **(B)** Le western blot est réalisé sur un extrait protéique immunoprécipité à partir de l'anticorps anti-FLAG. Le même anticorps a été utilisé pour la détection du motif FLAG sur les membranes.

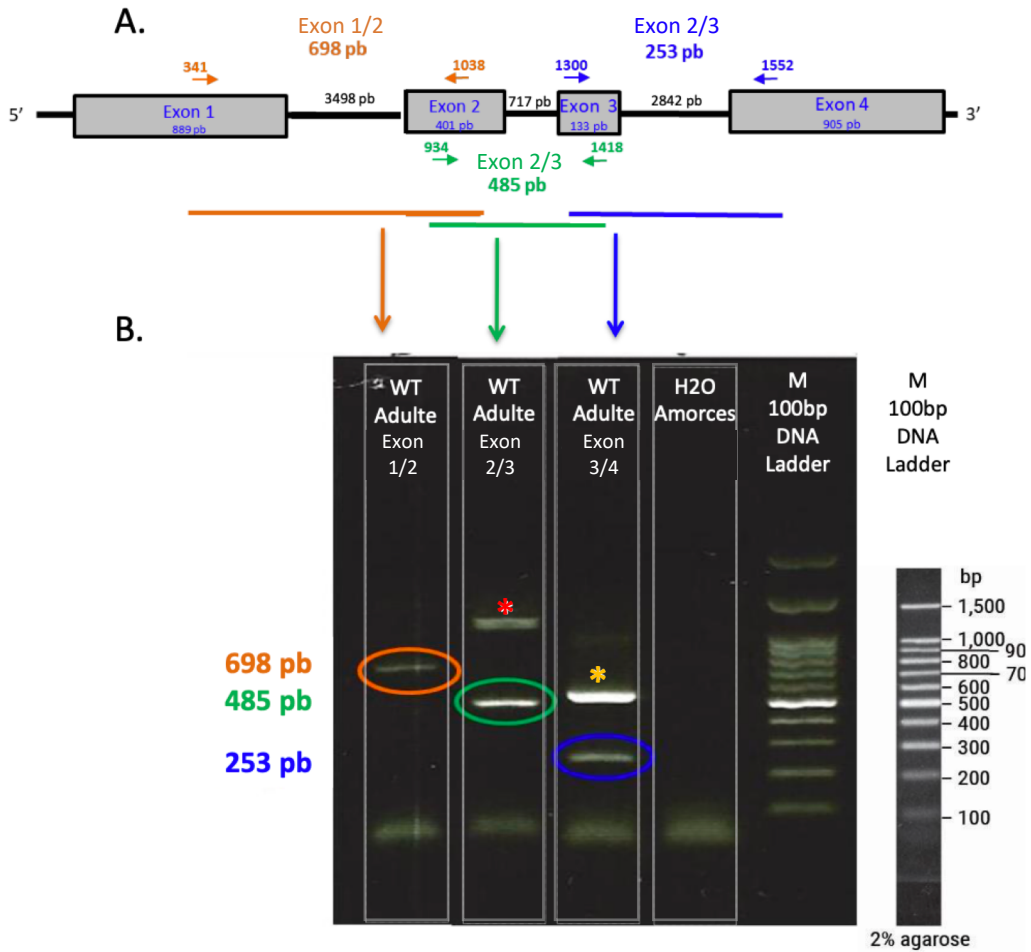
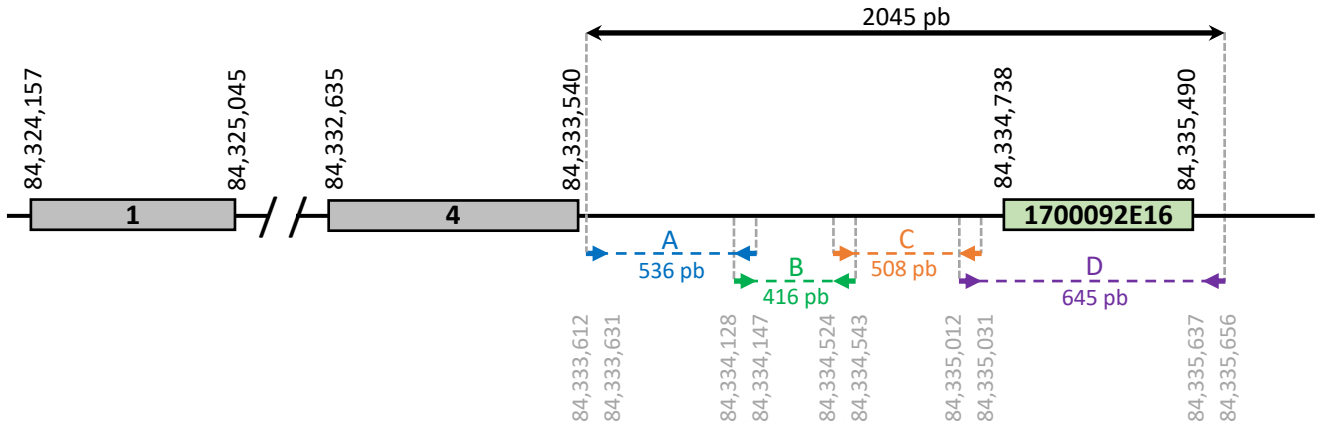


Figure 54 : Étude du transcrit *4930463O16Rik* et de son épissage.

(A) Représentation schématique du gène *4930463O16Rik*. **(B)** Gel d'électrophorèse montrant les produits de RT-PCR obtenus à partir d'ARN de testicules de souris WT avec les couples d'amorces nommés Exon1/2, Exon2/3 et Exon 3/4. Les produits PCR de taille supérieure désignés par * ont été séquencés : * est un fragment aspécifique; * est spécifique et comprend l'intron 2 non épissé.

A. musChr10
NC_000076.7



B.

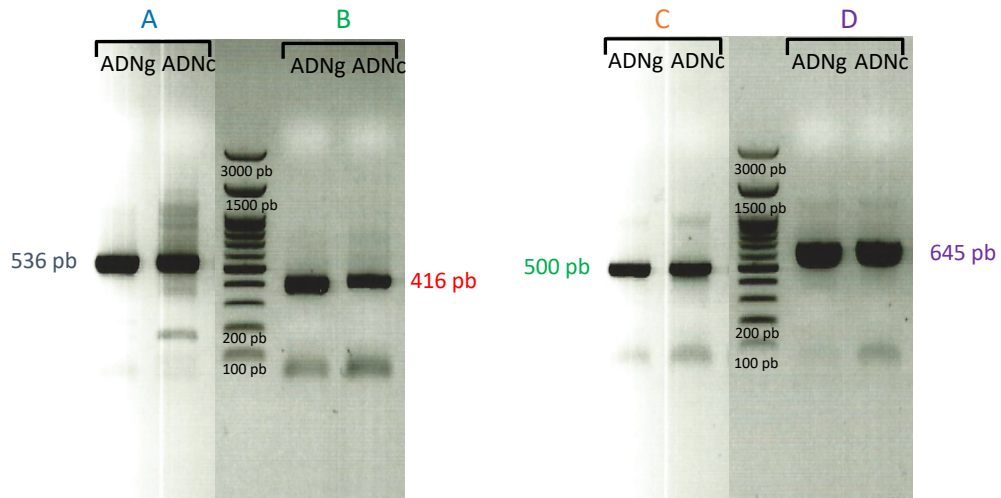
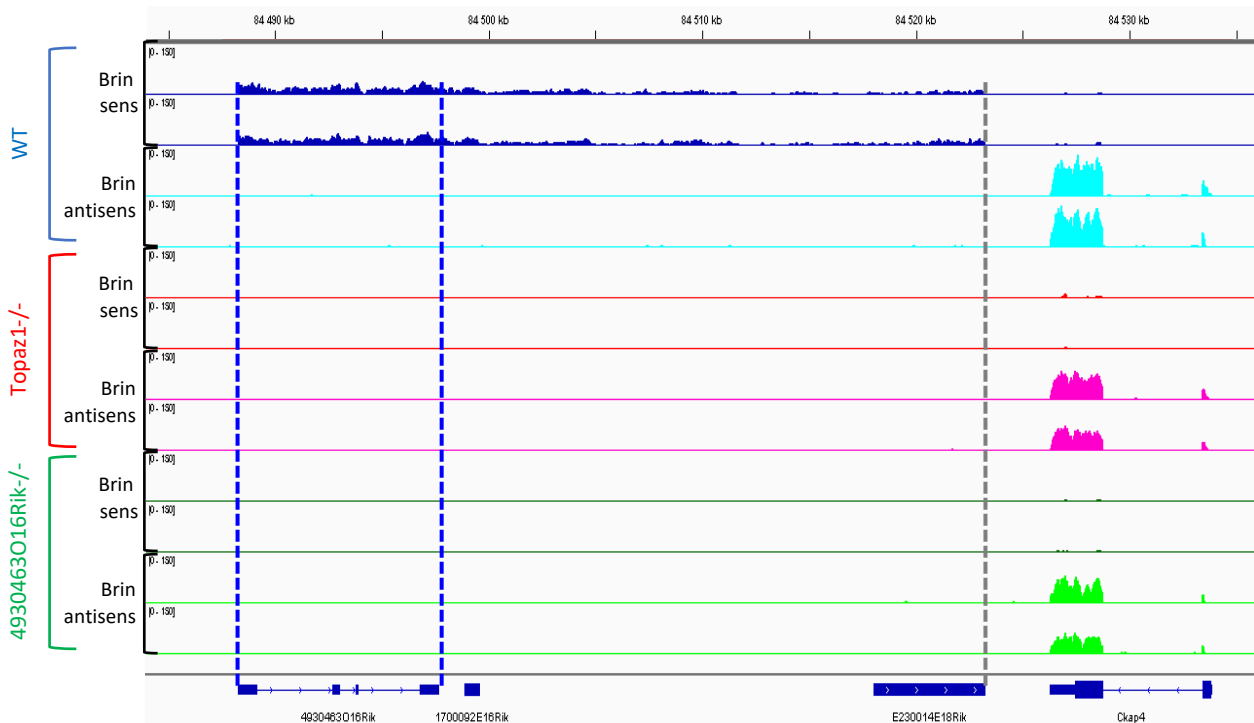


Figure 55 : Schéma de l'ADNg de l'exon 4 de 4930463O16Rik jusqu'au gène 1700092E16Rik avec les couples d'amorces utilisés.

(A) Schéma de l'extrémité 3' du 4930463O16Rik et de l'EST 1700092E16Rik. Représentation des couples d'amorces utilisés entre le 4930463O16Rik le gène 1700092E16Rik. (B) Gels d'électrophorèse avec les échantillons amplifiés par PCR avec les couples d'amorces A, B, C et D.

A. Chr10 : 84,483,853-84,535,824 – Brin sens et anti-sens



B.

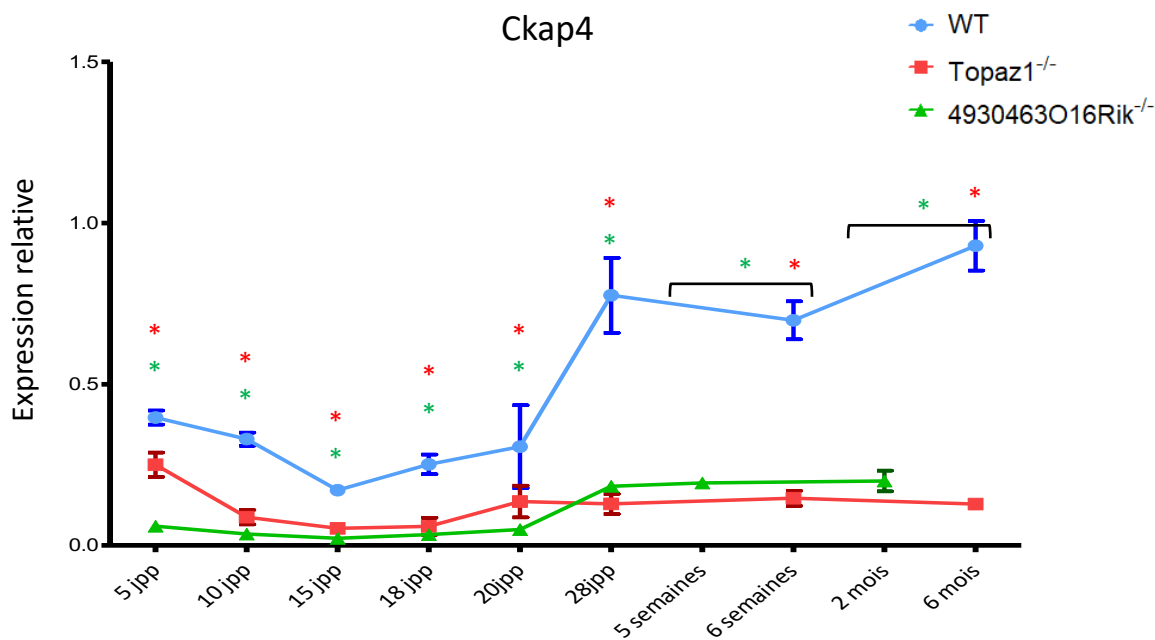


Figure 56 : Transcription dans la région 3' de *4930463O16Rik* et expression de *Ckap4*.

(A) Représentation des résultats de RNAseq avec le visualisateur de génome IGV de *4930463O16Rik* jusqu'à *Ckap4* issus des testicules de souris WT (bleu: brins sens; cyan: antisens), *Topaz1*^{-/-} (rouge: sens; rose: antisens) et *4930463O16Rik*^{-/-} (vert foncé: sens; vert clair: antisens). Tous les gènes observés sont sous-exprimés en absence de *Topaz1* ou de *4930463O16Rik*. (B) Profil d'expression de *Ckap4* dans ces 3 lignées de souris. La diminution d'expression de *Ckap4* est significative dès 5jpp dans les lignées mutantes *Topaz1*^{-/-} et *4930463O16Rik*^{-/-}. * $p < 0,05$; *Topaz1*^{-/-} vs WT. * $p < 0,05$; *4930463O16Rik*^{-/-} vs WT (test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

MATERIEL ET METHODES

Ne seront décrits ici uniquement les techniques qui ne sont pas retrouvées dans l'article de cette thèse soumis à publication.

I. Etude histologique des souris Topaz1^{-/-}

A. Étalement chromosomique.

Des testicules de souris de 28jpp ont été prélevés et immédiatement plongés dans une solution PBS (Phosphate buffered saline) 1X. L'albuginée du testicule est retirée et le tissu est dilacéré avec deux aiguilles jusqu'à obtenir une solution homogène. Après 5 minutes à décanter, la phase supérieure contenant les cellules germinales est récupérée puis centrifugée 5 minutes à température ambiante. Le culot récupéré est suspendu dans du PBS 1X pour obtenir une concentration cellulaire permettant à chaque cellule d'être isolée. La suspension cellulaire est déposée sur une lame en présence de nonylphénol éthoxylé (NP-40) dilué à 0.25% dans de l'eau. Après 30 secondes, la réaction d'étalement est stoppée par l'ajout de solution S-fix (1% de paraformaldéhyde, 10mL de borate de sodium à 100mM en eau). Une fois la solution évaporée des lames, celles-ci sont plongées dans une solution de photofluo à 0.4% (Kodak) puis séchées et stockées à -20°C en attendant d'être utilisées.

B. Immunohistologie sur étalement chromosomique.

Les lames sont immergées successivement dans une solution PBS-photofluo à 0,08% (5 minutes) puis dans une solution PBS-Triton à 0,01 % (5 minutes) et de nouveau dans la solution PBS-photofluo (5 minutes). Chaque coupe est recouverte de solution de Blocking Buffer (2% de sérum de veau fœtal (SVF), 18g/L de lait en poudre, 10g/L d'albumine bovine dilué dans du PBS 1X) pendant 30 minutes. Les lames sont incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué en solution "Blocking Buffer". La liste des anticorps et les concentrations respectives utilisées sont indiquées dans la **table 2**. Après plusieurs lavages, les anticorps secondaires conjugués à des longueurs d'onde de 488 et 594nm sont déposés, incubés 1 heure à 37°C et éliminés par lavage en PBS. Pour un double immunomarquage, un nouvel anticorps primaire est déposé sur les lames pendant 3 heures à 37°C. Puis les lames sont à nouveau lavées avant de déposer l'anticorps secondaire 1 heure à 37°C. Enfin, les lames sont incubées avec du DAPI dilué en PBS 1X (1:1000). Les lames sont montées avec le milieu Vectashiel Hard set (Vector) avant d'être stockées à 4°C (15 jours environ) ou observées au microscope.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Concentration	Espèce réactive
Meikin	Don de Y. Watanabe*		1/500	lapin
Rec8	Sigma	HPA031729	1/100	lapin
SA2	Abcam	Ab4463	1/200	chèvre
SYCP3	Abcam	Ab1591	1/100	lapin

*Dr Yoshinori Watanabe, Laboratory of Chromosome Dynamics, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Toyo, Japan

Table 2 : Liste des anticorps utilisés sur des étalements chromosomiques.

C. Préparation des testicules pour la microscopie électronique à transmission

Les testicules sont prélevés et immédiatement rincés en PBS 1X. Puis ils sont fixés en glutaraldéhyde 2% / paraformaldéhyde 1,5% dilué en PBS 1X avant d'être inclus dans une gélose (2% d'agarose dilué en cacodylate de sodium 0,1M pH=7,2). Les gonades sont ensuite confiées à la plateforme MIMA2 en vue d'études histologiques par M.E.T. (C.Longin, INRAE Jouy en Josas).

II. Insertion d'un FLAG histidine dans le BAC Topaz1 murin

A. Extraction ADN plasmidique :

L'ADN des BAC ou des plasmides est préparé à partir de cultures bactériennes faites en présence des antibiotiques nécessaires en utilisant le Kit NucleoBond Xtra BAC (MACHEREY-NAGEL / Purification MAXI Prep / Ref : 740436.25) et en suivant les instructions du fournisseur. Le dosage de l'ADN est réalisé au Nanodrop.

B. ADN FLAG pour la recombinaison :

La séquence ADN utilisée pour la recombinaison homologue (**Figure 49B**) a été synthétisée et fournie par le fabricant (Eurofins Genomics) dans le plasmide pEX-A258 résistant à l'ampicilline. Le fragment d'ADN nécessaire pour la recombinaison homologue est amplifié par PCR puis purifié (innuPREP PCR pure Kit, analytikjena). Une dialyse sur membrane (Type uSWP 0.025µm) pendant 2 heures est réalisée pour éliminer le surplus de sel avant l'électroporation.

C. Création de BAC-Topaz1-FLAG :

Un clone bactérien a été obtenu auprès de CHORI. La modification par recombinaison homologue a été effectuée comme indiqué dans le kit RedET (GeneBridges). En bref, ce protocole consiste à provoquer la recombinaison homologue dans les bactéries, ces dernières ayant été au préalable transformées par un vecteur d'expression d'une recombinase. Un fragment de recombinaison homologue est ensuite intégré dans la bactérie. L'événement de recombinaison, favorisé par la recombinase, est sélectionné par un antibiotique dont le gène, flanqué de deux sites très rares d'enzymes de restriction, a été associé au fragment de recombinaison. Le gène de résistance est ensuite éliminé par digestion par l'enzyme de restriction qui borde ce site. Au final, lorsque la recombinaison homologue a eu lieu, il persiste un site d'enzyme de restriction en plus de la modification génétique désirée. Il est bien sûr nécessaire de s'assurer que cette nouvelle séquence ne

provoquera pas d'effet délétère indésirable. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de placer ce site immédiatement en aval du codon STOP de TOPAZ1.

D. Condition de culture des cellules CHO.K1 :

Les cellules CHO.K1 sont cultivées dans le milieu F-12K dans lequel il a été ajouté 10% de SVF avec des antibiotiques (pénicilline, streptavidine et glutamine). Les cellules sont mises en culture dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂. Pour récupérer les cellules, un traitement à la trypsine est réalisé (GIBCO / 0.25% Trypsin EDTA 1X / Réf : 25200-056) pendant 3 minutes. Puis le milieu contenant les cellules en suspension est récupéré et centrifugé 5 minutes à 100xg. Les culots obtenus ont été congelés à -80°C pour des analyses ultérieures (extraction des protéines ou des ARNs).

E. Transfection dans les cellules CHO.K1 :

Les cellules CHO.K1 sont mises en culture jusqu'à atteindre une confluence de 80% pour réaliser la transfection. Le réactif JetPrime (POLYPLUS / Réf : 114-07) est utilisé selon les conditions données par le fabricant. Pour chaque boîte de culture (P100mm diamètre), 10 µg de l'ADN du BAC Topaz1-FLAG sont utilisés. Le mélange ADN/transfectant est incubé en présence des cellules pendant 7 heures. Puis le milieu de transfection est alors remplacé par le milieu de culture des cellules CHO.K1. Quarante-huit heures après, les cellules sont analysées.

F. RT-qPCR :

Le protocole est similaire à celui décrit dans l'article de cette thèse soumis à publication. Le gène de référence utilisé est la GAPDH. La liste des primers utilisés est disponible sur la **table 3**.

G. Extraction des protéines, Immunoprécipitation et Western Blot :

Un culot de cellules transfectées a été mis en suspension dans 1mL de tampon de lyse RIPA (50mM de TrisHCl pH8, 150mM de NaCl, 0.5% de Sodium deoxycholate, 1% de NP40 et 0.1% de solution de sodium dodecyl sulfate) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Mannheim, Germany). Après 30 minutes sur glace, les cellules sont centrifugées à 14 000xg pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré et un dosage des protéines est réalisé par colorimétrie avec la méthode de Bradford.

L'immunoprécipitation est effectuée par incubation d'un extrait de protéines (environ 100µg) pendant une nuit à 4°C sous agitation en présence d'anticorps (1µg). Puis, une suspension (100µl) de billes de protéine A/Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences AB ; Uppsala) est ajoutée et incubée 2

Gènes		Primers	
		5'-Forward-3'	5'-Reverse-3'
Tcaim		GCAGTCCTTCATGAGAACCA	AAACTGCTTTGTTGAAGCCTG
Ckap4		ACTGTGCCACACACGCAGT	TGGATGACCTGCGGAACGACCT
BAC	Topaz1-Exon 2	TGGCACCGGACTTGGTTAAA	TGGCACTTACTGCTCCTCTTTTT
	Topaz1-FLAG	GTGCTGCAGATTGTCCTGAA	CTTATCGTCGTCGTCCTTGTAGTC
Topaz1	Exon2	CAAATGGATGGCTTCACAGA	GAAATCCACAGAAAATGGGC
	Exon3/4	CGTTTCCCAAATGCCTAGTC	GACCACCAAGACACCTGTCA
	Exon 5	CACTAAGGATTGCCCTGCAC	CTTGTTGGAGAGCCTTGAGC
	Exon 6	CCTCTCATTTCATTAGCTCACT	GGAACAGGCTGAAGGTATGC
	Exon 7/8/9	TCAGTCAATGTTTCATGTGCTTG	AGCACATGTGTGAGGCCACT
	Exon 10/11	TGACATTTCTGGTCCCCTTC	AAAACAGCGGAGAGTGCTTC
	Exon 12	ACTCCTGCTGCCAATGTCTT	TGAGAGCACCAAGCTAGCAA
	Exon 13	CCAGAAGTTGGCTCAGCAGT	TTGGGGAGCAGATAGTCGAA
	Exon 14/15	CCCACCCAAAGCAGTACAAT	CTAGGTAGCCAGGGTTCGTG
	Exon 16/17/18	TGGAGAGGGCTCTATGTTGG	CTGGGCTCAGTTCCTAGCAT
	Exon 19	CAGTGTCAAATTGTCAAGATGC	GCCTGCAGTAGGTCTTGTCTT
	Exon 20	TCTGCCTTTGGGTTCACTTT	CAGTCATGGCATTGTTGTTGAC
4930463O16Rik	Exon 1/2	GTCCTTCCTTTGCGACATTG	AGAATTCAGAGTGGCACAGC
	Exon 2/3	TGAGAACTGCCTGAGCTAACAC	AATGAGGGCAGTGCCTAAGAC
	Exon 3/4	GTCAGCCTGCAAGAAATCC	GATGGTGGTTGTTGTTGGTG
	A	GCTGGATCACGCCTAGATTT	TGTTTGGGCAGACTGGCTAG
	B	CTAGCCAGTCTGCCCAAACA	TGGCCACAAGTTGACGTTAG
	C	CTAACGTCAACTGTGGCCA	AACAGCATATCCAGGATGC
	D	GCATCCTGGGATATGCTGTT	CTTGTTTCTTCTGGGGATG

Table 3 : Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR et RT-qPCR.

heures à 4°C. Les billes sont récupérées par centrifugation. Chaque culot de billes est déposé dans un puit de gel d'électrophorèse après dénaturation.

Pour chaque échantillon, 25µg de protéines totales ou de protéines immunoprécipitées sont dilués dans du tampon Laemmli 5X pour un volume final de 20µL. Les électrophorèses sont réalisées à l'aide de gels Mini-PROTEAN® TGX™ gels (Cat. 456-1083, Bio-Rad). Un marqueur de taille contenant des protéines colorées de poids moléculaire connus (gamme: 31-460 kD, Cat. LC5699, Invitrogen) est déposé sur chaque gel. Les produits de l'électrophorèse sont transférés sur membrane de difluorure de polyvinylidène (Hybond-P PVDF; Amersham) (nommé l'appareil BioRad de transfert). Les sites non spécifiques de fixation sont saturés par incubation de la membrane dans une solution tampon enrichie en protéines de lait écrémé (TBS Tween, 4% W/vol lait écrémé en poudre). L'incubation avec l'anticorps primaire est faite à 4°C pendant une nuit dans la même solution saturée en protéines de lait (sans Tween). L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est incubé pendant 45 minutes à température ambiante. La révélation de l'activité peroxydase est effectuée par utilisation du kit Pierce ECL-Plus (Thermo Scientific) selon les instructions du fabricant. L'observation est réalisée avec l'appareil ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad).

H. Immunocytologie :

Préalablement aux cultures cellulaires, des lamelles recouvertes de solution Poly-L-Lysine (Sigma) ont été déposées au fond des boîtes de culture. Une fois les expérimentations réalisées, les lamelles avec les cellules fixées ont été récupérées pour être incubées 20 minutes dans du PAF 2,5% à température ambiante. Après plusieurs rinçages, les lames sont incubées 1 heure dans du chlorure d'ammonium (54g/mol). Les lames sont rincées puis stockées dans du PBS1X à 4°C ou directement utilisé pour des immunocytologies.

Après un démasquage des épitopes antigéniques, les coupes sont plongées dans une solution de saturation et perméabilisation (PBS 1X/BSA 1%/ Triton 0,5%). Puis l'anticorps anti-Flag dilué au 1/500° est incubé pendant 1 nuit à 4°C. Après quelques lavages, les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire pendant 45 minutes à température ambiante. Du DAPI dilué au 1/1000° est déposé sur les lames et rincé. Les lames sont montées avec le milieu Vectashiel Hard set (Vector) avant d'être observées au microscope à fluorescence.

I. Hybridation in situ

Les manipulations de HIS ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans la publication de cette thèse.

III. Etude de la lignée *4930463O16Rik*^{-/-}

A. Extraction des ADN génomique (ADNg) :

Afin de réaliser les phénotypes des souris mutantes pour le gène *4930463O16Rik*, des extractions d'ADNg à partir d'un morceau de queue ou d'oreille de souris ont été réalisées. Les échantillons sont prélevés et digérés une nuit à 37°C sous agitation dans 400µL de tampon de protéinase K (50 mM de Tris/HCl pH8, 5 mM d'EDTA, 1% de SDS et 300 mM d'acétate de sodium pH=8) avec 4 µL de protéine K Recombinant PCR Grade. Le lysat est récupéré (250 µL) et un volume équivalent du mélange Phénol/Chloroforme (125µL de Phénol pH=8 et 125 µL de Chloroforme) est ajouté. Le mélange est vortexé et centrifugé 10 minutes à 13000xg. Le surnageant est récupéré et mélangé à 250 µL de chloroforme. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant est récupéré puis mélangé à un volume équivalent d'isopropanol et à 60 µL d'acétate de sodium (NaAc). Après centrifugation, le surnageant est éliminé pour ne garder que le culot d'ADNg. Après un rinçage dans de l'éthanol à 70%, le culot est légèrement séché puis repris dans un volume d'eau de 100 à 400 µL en fonction de sa taille.

B. RT-PCR :

Les expériences de PCR sont réalisées à partir de l'ADNg ou de l'ADNc dilué au 10^{ème}. Un microlitre de chaque échantillon est mélangé à 19 µL de mix PCR composé de 2 µL de tampon 10X, 1,6 µL de dNTP (désoxyribonucléoside triphosphate), 0,6 µL de chaque amorce, 0,2 µL de Taq Polymerase TAKARA et 14 µL d'eau. Les échantillons réalisent 35 cycles PCR puis ils sont conservés à 4°C ou ils sont mis à migrer sur un gel d'agarose 1,5% en TBE (Tris Borate EDTA buffer). La liste des primers utilisés est reportée dans la **table 3**.

C. RT-qPCR :

Les RT-qPCR pour le gène *Ckap4* ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans la publication. Les primers utilisés sont répertoriés dans la **table 3**.

DISCUSSION GENERALE

I. Rôle de Topaz1 au cours de la méiose murine

A. Les modèles murins avec des phénotypes similaires à Topaz1^{-/-}.

L'étude du phénotype des souris Topaz1^{-/-} a mis en évidence un défaut d'alignement des chromosomes le long de la plaque métaphasique en fin de prophase I de méiose uniquement chez les souris de sexe mâle. Les spermatocytes Topaz1^{-/-} sont bloqués lors de la transition prophase-métaphase I avant d'entrer en apoptose (Luangpraseth-Prosper *et al.*, 2015). Nous avons mis en évidence que ce blocage est associé à une mauvaise mise en place du fuseau de microtubules dans ces spermatocytes I: un fuseau de microtubule monopolaire est centré dans la cellule. Ces observations laissent supposer que la protéine TOPAZ1 est essentielle pour la mise en place des fuseaux de microtubules en prophase I de méiose et ainsi permettre à la métaphase de se dérouler correctement. Plusieurs blocages méiotiques pouvant ressembler à celui des souris Topaz1^{-/-} ont été observés dans différents modèles de souris mutantes.

- *Ccna1* est nécessaire pour l'activation de la transition en métaphase I des cellules germinales (**partie introduction.II.B.2.a.v**). L'inactivation du gène *Ccna1* chez la souris entraîne une stérilité mâle avec un blocage des spermatocytes à la fin du stade diplotène de prophase I méiotique (Liu *et al.*, 1998; Nickerson *et al.*, 2007) ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules germinales en apoptose (Panigrahi *et al.*, 2017). Les spermatocytes *Ccna1*^{-/-} présentent des défauts de dissociation du complexe synaptonémal avec un défaut de séparation des chromosomes (Liu *et al.*, 1998) : ces anomalies ne sont cependant pas observées dans les spermatocytes Topaz1^{-/-} (Luangpraseth-Prosper *et al.*, 2015). L'arrêt au stade diplotène des spermatocytes *Ccna1*^{-/-} est associé à un défaut d'activation de *Cdk1* (*Cdc2a*), partie intégrante du MPF via la répression de *cdc25* (Liu *et al.*, 1998).
- Autre lignée de souris présentant un arrêt de spermatogénèse en fin de diplotène est la lignée *Emi2*^{-/-} (stérilité dans les deux sexes) (Gopinathan *et al.*, 2017). L'absence de *Emi2* (*Fbxo43*) entraîne un blocage méiotique des spermatocytes en diplotène, associé à une diminution de *Ccna1* et de l'activité *Cdk1*.

L'implication de l'*Emi2* et de la cycline A1 à des stades similaires suggère une coopération entre les deux dans la régulation de la spermatogénèse. Nos résultats de RNA-seq montrent que *Ccna1* est bien un DEG à P18 dans les testicules Topaz1^{-/-} (Adj pval < 0,01 et FC = 9,85), ainsi que *Emi2* (Adj pval < 0,01 et FC = 2,37). *Cdk1*, activateur de la sous-unité catalytique du MPF, est dérégulé dans les KO *Ccna1* et

Emi2 mais pas dans le KO *Topaz1*. Par contre, dans ce dernier, *Myt1*, activateur de Cdc25 est sous-exprimé (Adj pval < 0,01 et FC = 2,36). Reste à savoir si *Topaz1* peut s'intégrer dans cette régulation du MPF.

- MLH1 est nécessaire pour la formation des chiasma (**partie Introduction.II.B.2.a.iii**) au cours de la méiose et la suppression de son gène chez la souris entraîne une stérilité dans les deux sexes. Dans ce modèle murin, il n'y a pas de formation des chiasmats mais ceci n'affecte pas la dissociation du complexe synaptonémal ainsi que l'initiation de la métaphase. Les spermatocytes *Mlh1*^{-/-} en métaphase présentent des défauts d'alignement des chromosomes le long de la plaque métaphasique. Les cellules germinales *Mlh1*^{-/-} entrent en apoptose (Eaker *et al.*, 2002). Malgré la désorganisation des chromosomes en métaphase, les spermatocytes *Mlh1*^{-/-} organisent correctement le fuseau bipolaire de microtubules. L'expression de *Mlh1* dans les testicules de souris *Topaz1*^{-/-} n'est pas modifiée.
- Le gène *Meioc* est indispensable pour assurer la fertilité des souris mâles et femelles (Abby *et al.*, 2016). Ce gène est impliqué dans la stabilisation des transcrits nécessaires pour la méiose. Les spermatocytes *Meioc*^{-/-} n'achève pas la prophase I et les spermatocytes sont bloqués au stade zygotène. Cependant, les spermatocytes présentent une ressemblance avec un stage méiotique qualifié de "métaphase like", avec des chromosomes condensés organisés en couronne autour d'un fuseau monopolaire (Abby *et al.*, 2016; Soh *et al.*, 2017). *Meioc* est légèrement dérégulé à 18 jpp dans le testicule en absence de *Topaz1* (Adj pval < 0,01 et FC = 1.51)).

Le phénotype des spermatocytes obtenu lors de la suppression de *Mlh1* et *Meioc* ressemble à celui de *Topaz1*^{-/-}. Ainsi, on pourrait supposer que TOPAZ1 utilise certains mécanismes de régulation similaires à MEIOC ou MLH1, spécifiquement dans le testicule, puisque, seule la mutation de *Topaz1*, met en évidence un phénotype sexe dimorphique.

B. Mécanismes perturbés dans les spermatocytes *Topaz1*^{-/-}

Les observations précédentes laissent supposer que *Topaz1* est essentiel pour la mise en place des fuseaux de microtubules lors de la transition de prophase-métaphase I de méiose. Cette hypothèse s'appuie sur les analyses transcriptomiques qui ont mis en évidence un nombre important de DEGs impliqués dans l'organisation des microtubules (cil, cytosquelette, flagelle), au niveau des complexes de protéines associées aux microtubules (dynéines, kinésines) et au niveau des centres organisateurs des microtubules (centrioles et PCM). Ces facteurs peuvent être régulés de façon directe ou indirecte par la protéine TOPAZ1 pour assurer la transition de prophase –métaphase I de méiose.

1. Stérilité liée à des anomalies de nucléations, stabilisation et/ou déstabilisation des microtubules

Des anomalies de formation du fuseau bipolaire ont été observées dans un nombre important de cellules en mitose, système d'étude plus facilement accessible et manipulable que les cellules en méiose. Dans les cellules somatiques, des expérimentations ont permis de mettre en évidence des gènes essentiels pour la formation du fuseau bipolaire. Certaines dérégulations entraînent la formation d'un fuseau mitotique monopolaire. La dynamique des microtubules est affectée par divers facteurs, notamment des drogues/médicaments (par exemple, la colchicine), la température, le GTP, la disponibilité en tubuline libre et les protéines associées aux microtubules (Delphin *et al.*, 2012; Gombos *et al.*, 2013; Holmfeldt, 2003; Watanabe and Goshima, 2014).

Dans des cultures de cellules Hela, la perturbation du gradient Ran-GTP entraîne une perturbation de la métaphase avec la formation d'un fuseau monopolaire (Kaláb *et al.*, 2006). Il semble exister un équilibre de régulation positive ou négative dans ces cellules qui, lors d'une dérégulation en fin de prophase, va influencer la stabilité des microtubules autour de la chromatine. Le gradient de Ran-GTP et les voies régulées par Ran sont indispensables pour la formation du fuseau bipolaire dans ces cellules somatiques.

Toujours *in vitro*, la stabilisation de la dynamique des microtubules entraîne la formation d'un fuseau monopolaire de mitose. En effet, la surexpression du facteur MAP4 (pour microtubule associated protein 4, protéine cytosolique associée aux microtubules) dans différentes lignées cellulaires (K562, Juskat et DG75), stabilise les microtubules pendant toutes les phases du cycle cellulaire et provoque la formation d'un fuseau monopolaire (Holmfeldt, 2003). Les auteurs montrent aussi une régulation négative directe de l'activité de la MAP4 par une faible concentration de tubuline libre dans le cytoplasme. Ces résultats mettent en évidence que la dynamique de nucléation des microtubules est finement régulée pour assurer la formation d'un fuseau mitotique bipolaire lors de la métaphase. On pourrait faire l'hypothèse qu'une telle stabilisation des microtubules entraîne également la formation d'un fuseau monopolaire dans les cellules en métaphase I de méiose.

L'observation systématique de fuseaux monopolaires dans les spermatocytes I *Topaz1^{-/-}* pourrait être la conséquence d'un défaut de nucléation et/ou de stabilisation des microtubules. TOPAZ1 pourrait agir directement ou indirectement sur le gradient de RanGTP et/ou sur la stabilisation/déstabilisation des microtubules du fuseau méiotique (TOPAZ1 est indispensable pour le fuseau mitotique).

2. Stérilité liée aux centrosomes

Les centrosomes jouent un rôle prépondérant dans l'organisation et la mise en place du fuseau de microtubules. L'étude de ces organelles par immunohistochimie dans les spermatocytes *Topaz1^{-/-}* a mis évidence des anomalies de localisation des centrosomes. Les centrosomes ne migrent pas aux pôles des spermatocytes en fin de prophase I mais restent centrés dans la cellule. Nous avons cependant observé que les centrosomes semblent bien se dupliquer en absence de *Topaz1*. Ainsi deux hypothèses sont avancées :

- Les centrosomes dupliqués sont dans l'incapacité de se séparer l'un de l'autre et donc de migrer aux pôles des cellules méiotiques.
- Les centrosomes dupliqués sont séparés mais ils ne peuvent pas migrer aux pôles de la cellule pour organiser le fuseau bipolaire méiotique.

Ces hypothèses sont appuyées par les observations du marquage de la γ -tubuline (immunofluorescence) qui est ponctiforme dans les spermatocytes WT alors que ce marquage est diffus dans les spermatocytes *Topaz1^{-/-}*. Ce marquage pourrait indiquer des anomalies de l'architecture des centrosomes ou du PCM (matériel péricentriolaire) en absence de TOPAZ1, entraînant l'absence de séparation et/ou de migration des centrosomes aux pôles de la cellule en fin de prophase I de méiose.

Dans les cellules mitotiques, des dérégulations de l'organisation du MTOC ont mis en évidence l'importance de ce système pour la mise en place du fuseau mitotique (**partie Introduction.II.C.1**). La protéine CEP192 (pour *centrosomal protein of 192kDa*) est une protéine d'échafaudage du PCM colocalisée avec la γ -tubuline centromérique. La sous-expression de Cep192 dans des cellules HeLa, entraîne la formation de fuseaux de microtubules mitotiques désorganisés dans 80% des cas. Parmi eux, 18% de fuseaux sont de types monopolaires (Gomez-Ferreria *et al.*, 2007). De plus, CEP192 semble nécessaire pour la maturation des centrosomes puisque sa sous-expression en cellules HeLa ne permet pas aux centrioles de se localiser aux pôles de la cellule en division. CEP192 est donc nécessaire pour la maturation des centrioles et la formation du fuseau bipolaire de mitose dans ces cellules humaines. L'intégrité des protéines centrosomales est nécessaire pour la formation d'un fuseau bipolaire et la division mitotique et méiotique. L'expression de Cep192 n'est pas dérégulée dans les testicules *Topaz1^{-/-}* mais celles d'autres gènes codant pour des protéines centrosomale le sont, comme Cep131, Cep126, Cep63. Ces protéines ont été observées au niveau des centrosomes (Bonavita *et al.*, 2014; Kashihara *et al.*, 2019; Marjanović *et al.*, 2015; Siller *et al.*, 2017; Staples *et al.*, 2012). Durant la mitose, la protéine CEP126 est colocalisée avec la γ -tubuline au niveau du centrosome. Une sous-expression de CEP126 entraîne la formation d'un fuseau de mitose anormal (Bonavita *et al.*, 2014). D'autres

études ont montré que l'invalidation du gène *Cep63* ou *Cep164* chez la souris entraîne une infertilité uniquement chez le mâle (Marjanović *et al.*, 2015; Siller *et al.*, 2017). La sous expression de ces CEP en absence de *Topaz1* pourrait entraîner des anomalies de maturation des centrosomes dans les spermatocytes et ainsi un blocage méiotique.

La séparation et la migration des centrosomes sont assurées par les protéines motrices associées aux microtubules.

Les dynéines cytoplasmiques associées à l'enveloppe nucléaire sont également des moteurs de la séparation des centrosomes. Dans la majorité des lignées cellulaires, une inhibition ou une déplétion des dynéines ne bloque pas la séparation des centrosomes mais la distance entre les centrosomes est diminuée (Raaijmakers *et al.*, 2012; Tanenbaum *et al.*, 2009; Tikhonenko *et al.*, 2013). L'importance de la voie de dynéine pourrait donc avoir un rôle primordial pour la séparation des centrosomes en prophase I de méiose.

Dans l'ensemble, ces observations nous laissent supposer que le fuseau monopolaire observé en absence de *Topaz1* pourrait provenir d'une dérégulation des protéines du centrosome ou des protéines motrices de kinésines ou de dynéines. TOPAZ1 pourrait cibler directement ou indirectement ces éléments du cytosquelette durant la méiose.

L'absence de phénotype chez les femelles *Topaz1*^{-/-} renforcerait l'hypothèse d'une fonction de *Topaz1* dans la régulation des protéines des centrosomes. En effet, les ovocytes murins sont acentrosomiques : la formation du fuseau méiotique est réalisée en absence de centrosome dans les ovocytes murins (**voir partie Introduction.II.B.3**) (Manandhar *et al.*, 2005). L'implication de TOPAZ1 dans l'intégrité des centrosomes des spermatocytes expliquerait le phénotype de la lignée *Topaz1*^{-/-}.

3. Stérilité liée aux kinétochores ou au complexe de cohésines

Les kinétochores sont des structures essentielles pour la ségrégation correcte des chromosomes lors des divisions cellulaires (méiose et mitose). La visualisation de la protéine MEIKIN, spécifique de la méiose, dans les spermatocytes *Topaz1*^{-/-} a mis en évidence une co-localisation de cette protéine avec SYCP3 comparable aux observations dans des spermatocytes *Topaz1*^{+/-}. L'expression et la localisation de cette protéine ne sont pas perturbées en absence de *Topaz1*.

Les protéines du complexe de cohésines ubiquitaire (SA2) ou spécifique de la méiose (Smc1β, REC8) ne présentent pas de différence de localisation entre les spermatocytes *Topaz1*^{+/-} et *Topaz1*^{-/-}. Ainsi la localisation de ces protéines n'est pas dérégulée en absence de *Topaz1*.

Ces résultats suggèrent que l'organisation des complexes de cohésines ainsi que celle des kinétochores ne semblent pas altérée en absence de *Topaz1* pour les protéines étudiées.

II. Rôle des lncARNs dans la fertilité murine

L'inactivation de *Topaz1* entraîne la dérégulation d'un nombre important de transcrits dans les testicules dont environ ¼ de lncARNs, soulignant leur importance dans la spermatogenèse murine.

Le testicule est l'un des tissus (avec le cerveau) qui présente la plus forte expression de lncARN (Sarpoulos *et al.*, 2019; Soumillon *et al.*, 2013). Plusieurs lncARNs dérégulés (dont *4930463O16Rik*, *Gm21269*, *4921513H07Rik*) présentent une expression spécifique du testicule. Des études ont mis en évidence que les lncARNs testiculaires voient leurs expressions augmenter lors de la méiose et dans les spermatides (Bao *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018; Taylor *et al.*, 2015), suggérant un rôle important des lncARNs pour la division méiotique et la spermiogénèse.

Wichman *et al.* (2017) ont répertorié les lncARNs exprimés différenciellement entre spermatogonies et spermatocytes, et entre spermatocytes et spermatides. Ainsi, 1630 lncARNs sont différenciellement exprimés entre spermatogonies et spermatocytes du stade pachytène (927 lncARNs voient leurs expressions augmentées (dans les spermatocytes ($\text{Log}_2\text{FC} > 0$)). A peu près le même nombre de lncARNs (1534) sont significativement différentiels entre spermatocytes et spermatides (929 lncARNs voient leur expression augmenter dans les spermatides) (Wichman *et al.*, 2017). Dans cette analyse, *4930463O16Rik* présente une expression différentielle entre les différents stades étudiés : son expression est régulée à la hausse entre les spermatogonies et les spermatocytes puis diminuée dans les spermatides d'où un pic d'expression dans les spermatocytes au stade pachytène (Wichman *et al.*, 2017) similaire à nos observations (voir l'article). Différents lncARNs dérégulés dans les testicules *Topaz1*^{-/-} suivent ce même schéma d'expression (Wichman *et al.*, 2017). Ces lncARNs pourraient donc être des candidats pour l'étude de lncARN impliqués dans la méiose.

L'étude de 3 lncARNs dérégulés dès 16 jpp dans les testicules *Topaz1*^{-/-} a mis en évidence une localisation cellulaire différente pour chacun d'eux. Le lncARN *4930463O16Rik* présente une localisation nucléaire, *Gm21269* semble localisé dans le noyau et le cytoplasme alors que *4921513H07Rik* serait cytoplasmique. Il a été montré que des lncARNs cytoplasmiques peuvent réguler la traduction des ARNm ou intervenir au niveau des modifications post-traductionnelles des protéines (Yao *et al.*, 2019). L'étude récente de Li *et al.* (2021) a établi une liste des lncARNs qui pourraient présenter une fonction importante durant la méiose. *Gm21269* et *4921513H07Rik* font partis de cette liste de gènes.

La délétion du lncARN *4930463O16Rik* a mis en évidence que ce lncARN n'est pas nécessaire pour la fertilité chez les souris mâles. L'inactivation de *Tsln1* (testis specific long non-coding RNA 1) réduit la concentration spermatique sans affecter la stérilité des souris (Wichman *et al.*, 2017) : ce

phénotype est similaire aux souris *4930463O16Rik*^{-/-}. Cependant, l'absence du lncARN *4930463O16Rik* entraîne un phénotype plus drastique avec un changement des paramètres de motilité qui ne sont pas observés chez les souris *Tslrn1*^{-/-}. Dans les deux cas, même si ces lncARNs sont majoritairement exprimés au stade pachytène de méiose I, il semble qu'ils n'aient pas de rôle direct lors de la méiose. Une redondance fonctionnelle de tous ces lncARNs serait une hypothèse de travail ultérieur.

Il a été mis en évidence que certains ARNm transcrits dans les testicules présentent des épissages alternatifs spécifiques à ce tissu. Plus précisément, l'épissage alternatif des ARNm a été observé majoritairement dans les spermatocytes et les spermatides (Naro *et al.*, 2017; Soumillon *et al.*, 2013). La rétention d'intron, l'épissage alternatif le plus retrouvé dans les spermatocytes, augmente la stabilité des transcrits et donc leur durée de vie pour être utilisés au moment opportun par les cellules (Naro *et al.*, 2017). De tels mécanismes pourraient être envisagés dans le cas des lncARNs. Nous avons mis en évidence un épissage alternatif de l'intron 2 du lncARN *4930463O16Rik* qui pourrait permettre la stabilisation de ce lncARN.

Enfin, étant donné le rôle de certains lncARNs dans la régulation de la transcription (Yao *et al.*, 2019), on peut supposer un rôle similaire pour le lncARN *4930463O16Rik*. Cette régulation de la transcription pourrait avoir lieu suivant différents mécanismes moléculaires. Par exemple, des lncARNs peuvent remodeler la chromatine en recrutant ou en empêchant le recrutement des modificateurs de la chromatine au niveau de l'ADN (Jain *et al.*, 2016; McHugh *et al.*, 2015; Rinn *et al.*, 2007). L'étude des partenaires potentiels du lncARN *4930463O16Rik* pourrait éclairer les connaissances sur son mode d'action et son rôle dans le testicule murin.

L'étude des lncARNs durant la spermatogenèse constitue un travail complexe étant donné:

- le nombre important de lncARNs exprimés au cours de cette période et notamment avant la première division méiotique,
- le nombre de modèles de souris mutées pour des lncARNs ne montrant aucun phénotype testiculaire (Li *et al.*, 2020, 2021; Wen *et al.*, 2016). L'absence de phénotype n'est cependant pas synonyme d'une absence de fonction.

III. Hypothèse d'une régulation de Ckap4 par *4930463O16Rik*:

CKAP4 est une protéine transmembranaire ubiquitaire de type II (transmembranaire du réticulum endoplasmique (RE)). Le domaine cytosolique de CKAP4 a la capacité de lier les microtubules pour un ancrage du RE aux microtubules (voir la revue Vedrenne and Hauri, 2006). La partie luminale peut former des complexes avec d'autres protéines (dont des CKAP4 voisines) CKAP4 est aussi capable

de lier la ribonucléase Dicer au RE et régulerait la voie de miARN (Pépin *et al.*, 2012). Une petite fraction de protéine CKAP4 est aussi présente au niveau de la membrane plasmique de certains types cellulaires (pneumocytes, cellules épithéliales de vessie, cellules musculaires lisses vasculaires) (Conrads *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2006; Razzaq *et al.*, 2003). Dans les cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney, cellules rénales épithéliales) il a été montré que CKAP4 est également un récepteur pour la protéine DKK1 (pour *Dickkopf1*). DKK1 est une protéine sécrétée qui antagonise la signalisation Wnt notamment en bloquant les récepteurs LRP5/6 (Glinka *et al.*, 1998). De plus, l'association DKK1 sur son récepteur CKAP4 promeut la prolifération cellulaire (cellules normales ou cancéreuses) en activant la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT (*AKT serine/threonine kinase 1* aussi appelé PKB pour *protein kinase B*) (Kimura *et al.*, 2016). A notre connaissance, aucun rôle de CKAP4 n'a été décrit dans les gonades mais nos résultats de RNA-seq et ceux disponibles via la database "The ReproGenomics Viewer" (<https://rgv.genouest.org>) confirment l'expression de *Ckap4* dans les ovaires et les testicules murins (Darde *et al.*, 2015, 2019) (**Figure 57**). *Ckap4* est situé sur le brin opposé en 3' de *4930463O16Rik*. La suppression de *Topaz1* entraîne une quasi-absence de transcription de *4930463O16Rik* et une diminution de l'expression de *Ckap4* de 1,7 fois dans les testicules de 18jpp. La suppression de *4930463O16Rik* ne modifie pas l'expression de *Topaz1* mais entraîne une diminution de l'expression de *Ckap4* de 1,7 fois dans les testicules de 18 jpp. Une régulation positive de *Ckpa4* par le lncARN *4930463O16Rik* pourrait être envisagée mais reste à démontrer.

Dans les lignées *Topaz1*^{-/-} et *4930463O16Rik*^{-/-}, la diminution de l'expression de *Ckap4* pourrait perturber la signalisation dépendante de la voie PI3K/AKT. La signalisation AKT est impliquée dans la migration, l'invasion et l'adhésion cellulaire selon le type cellulaire (revue de (Manning and Cantley, 2007). Dans le testicule, la voie PI3K/AKT/mTOR (pour *mammalian target of rapamycin*) est impliquée dans la régulation de l'autophagie et l'apoptose (Huang *et al.*, 2019; Saiki *et al.*, 2011). Par exemple, le stress oxydatif régule négativement la voie PI3K/AKT/mTOR ce qui active l'autophagie. A l'inverse, l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR favorise la prolifération cellulaire et inhibe l'autophagie (Degtyarev *et al.*, 2008; Huang and Ho, 2006; Saiki *et al.*, 2011). La diminution de l'expression de *Ckap4* pourrait entraîner une diminution de l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR favorisant la phagocytose et/ou l'apoptose des cellules germinales dans le testicule. L'étude ontologique de nos résultats de RNA-seq a mis en évidence des clusters de gènes associés à la régulation de l'apoptose et de la phagocytose dans les testicules *Topaz1*^{-/-} et *4930463O16Rik*^{-/-} à 18 jpp.

Expression de Ckap4

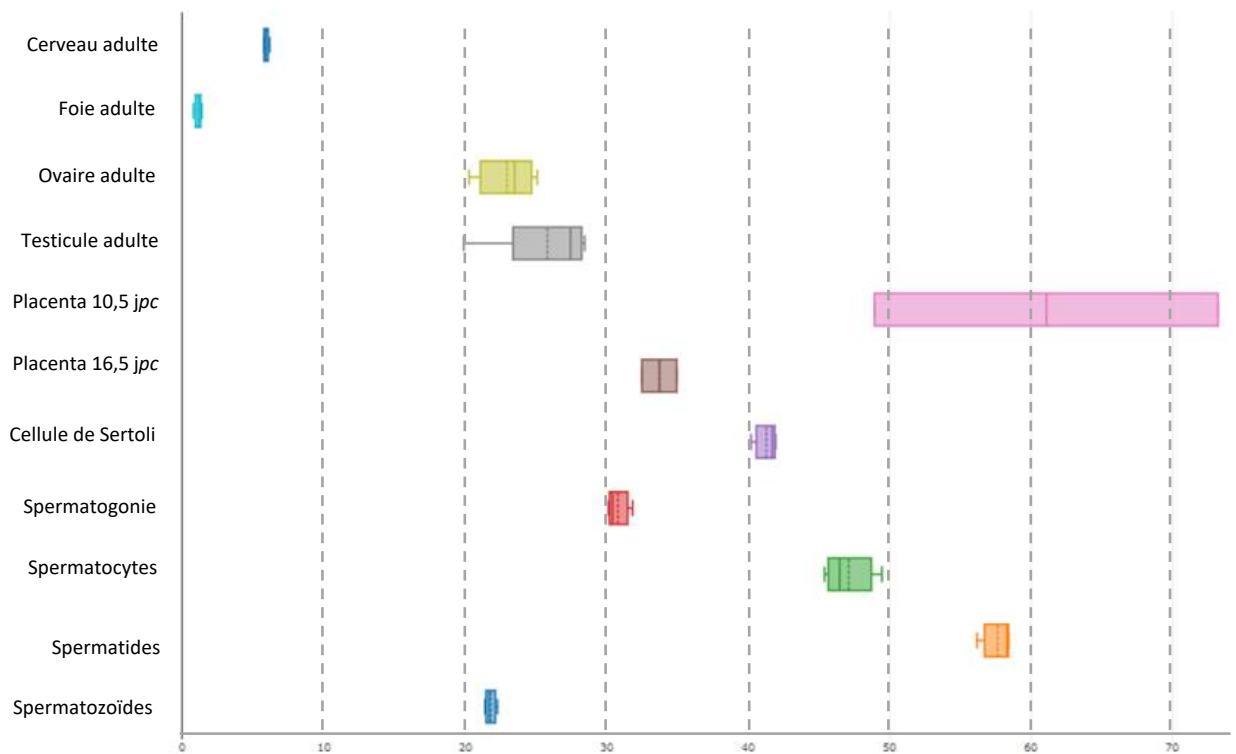


Figure 57 : Expression dynamique de Ckap4 dans différents tissus.

Données issues de Soumillon *et al*, (2013) visualisées à partir de « *The Repro Genomics Viewer* » (<https://rgv.genouest.org>).

CONCLUSIONS/PERSPECTIVES

Topaz1 est un gène indispensable pour la spermatogenèse murine (Luangpraseuth-Prosper *et al.*, 2015). L'étude de l'arrêt méiotique chez les souris Topaz1^{-/-} a permis de mettre en lumière les dérégulations transcriptomiques dans les testicules à 16 et 18 *jpp* avec une réponse accrue au stress cellulaire (dès 16*jpp*) ainsi que des voies de régulations altérées principalement dans la spermatogenèse, la dynamique des microtubules et au niveau des centrosomes. L'étude immunohistologique des spermatocytes Topaz1^{-/-} a mis en évidence des anomalies de mise en place du fuseau bipolaire et des centrosomes. Plusieurs pistes restent à étudier pour poursuivre l'étude de Topaz1 :

- L'études des protéines de dynéines et de kinésines qui sont nécessaires pour la formation d'un fuseau bipolaire.
- L'étude de protéines du centrosome par immunofluorescence et l'ultrastructure des centrosomes par microscopie électronique.
- La création d'une lignée de souris avec la protéine TOPAZ1 flaguée dans le but d'étudier sa localisation et ses partenaire (ARN, protéine ou chromatine).

En parallèle, l'étude du transcriptome testiculaire a mis en évidence une proportion importante de lncARNs dérégulées en absence de Topaz1. L'étude de 3 d'entre eux montre qu'ils sont exprimés principalement dans les spermatocytes I au stade pachytène. L'invalidation du lncARN *4930463O16Rik* montre qu'il n'est pas nécessaire pour assurer la fertilité chez la souris. Néanmoins, son absence affecte les paramètres spermatiques (diminution de la fertilité et augmentation de la motilité). Une suppression des lncARNs *Gm21269* et *4921513H07Rik*, en simple, double ou triple KO, pourrait mettre en évidence un rôle de ces gènes lors de la spermatogenèse murine.

Les lncARNs testiculaires représentent un champ d'investigations pour comprendre pourquoi ils sont si nombreux dans le testicule à certaines périodes de la spermatogenèse.

BIBLIOGRAPHIE

- Abby, E., Tourpin, S., Ribeiro, J., Daniel, K., Messiaen, S., Moison, D., Guerquin, J., Gaillard, J.-C., Armengaud, J., Langa, F., *et al.* (2016). Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nat. Commun.* **7**, 10324.
- Abdelmohsen, K., Panda, A.C., Munk, R., Grammatikakis, I., Dudekula, D.B., De, S., Kim, J., Noh, J.H., Kim, K.M., Martindale, J.L., *et al.* (2017). Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by *CircPABPN1*. *RNA Biol.* **14**, 361–369.
- Abel, M.H., Wootton, A.N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P.G., and Charlton, H.M. (2000). The Effect of a Null Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene on Mouse Reproduction¹. *Endocrinology* **141**, 1795–1803.
- Achermann, J.C., Ozisik, G., Ito, M., Orun, U.A., Harmanci, K., Gurakan, B., and Jameson, J.L. (2002). Gonadal Determination and Adrenal Development Are Regulated by the Orphan Nuclear Receptor Steroidogenic Factor-1, in a Dose-Dependent Manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 1829–1833.
- Adams, I.R., and McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 1155–1164.
- Adelman, C.A., and Petrini, J.H.J. (2008). ZIP4H (TEX11) Deficiency in the Mouse Impairs Meiotic Double Strand Break Repair and the Regulation of Crossing Over. *PLoS Genet.* **4**, e1000042.
- Ahmed, E.A., van der Vaart, A., Barten, A., Kal, H.B., Chen, J., Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Bartkova, J., Bartek, J., and de Boer, P. (2007). Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: Lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair* **6**, 1243–1254.
- Aitken, R.J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A.J., Lee, Y.H., and Baker, M.A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J. Androl.* **9**, 554–564.
- Allan, C.M., Garcia, A., Spaliviero, J., Zhang, F.-P., Jimenez, M., Huhtaniemi, I., and Handelsman, D.J. (2004). Complete Sertoli Cell Proliferation Induced by Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Independently of Luteinizing Hormone Activity: Evidence from Genetic Models of Isolated FSH Action. *Endocrinology* **145**, 1587–1593.
- Allan, D.J., Harmon, B.V., and Roberts, S.A. (1992). Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif.* **25**, 241–250.
- Allen, J.W., Dix, D.J., Collins, B.W., Merrick, B.A., He, C., Selkirk, J.K., Poorman-Allen, P., Dresser, M.E., and Eddy, E.M. (1996). HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* **104**, 414–421.
- Alleva, B., and Smolikove, S. (2017). Moving and stopping: Regulation of chromosome movement to promote meiotic chromosome pairing and synapsis. *Nucleus* **8**, 613–624.
- Altesha, M.-A., Ni, T., Khan, A., Liu, K., and Zheng, X. (2019). Circular RNA in cardiovascular disease: ALTESHA *ET AL.* *J. Cell. Physiol.* **234**, 5588–5600.
- Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M., and Page, D.C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14976–14980.
- Anderson, R., Copeland, T.K., Schöler, H., Heasman, J., and Wylie, C. (2000). The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech. Dev.* **91**, 61–68.

- Ang, C.E., Trevino, A.E., and Chang, H.Y. (2020). Diverse lncRNA mechanisms in brain development and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *65*, 42–46.
- Anguera, M.C., Ma, W., Clift, D., Namekawa, S., Kelleher, R.J., and Lee, J.T. (2011). Tsx Produces a Long Noncoding RNA and Has General Functions in the Germline, Stem Cells, and Brain. *PLoS Genet.* *7*, e1002248.
- Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 5319–5323.
- Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T., and Hannon, G.J. (2008). A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to De Novo DNA Methylation in Mice. *Mol. Cell* *31*, 785–799.
- Ariyaratne, H.B.S., and Chamindrani Mendis-Handagama, S.M.L. (2000). Changes in the Testis Interstitium of Sprague Dawley Rats from Birth to Sexual Maturity¹. *Biol. Reprod.* *62*, 680–690.
- Armstrong, J.F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W.A., Hastie, N.D., and Bard, J.B.L. (1993). The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* *40*, 85–97.
- Arun, G., Akhade, V.S., Donakonda, S., and Rao, M.R.S. (2012). mrhl RNA, a Long Noncoding RNA, Negatively Regulates Wnt Signaling through Its Protein Partner Ddx5/p68 in Mouse Spermatogonial Cells. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3140–3152.
- Auharek, S.A., and de França, L.R. (2010). Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J. Anat.* *216*, 577–588.
- Avidor-Reiss, T., and Fishman, E.L. (2019). It takes two (centrioles) to tango. *Reprod. Camb. Engl.* *157*, R33–R51.
- Azimzadeh, J., Hergert, P., Delouvé, A., Euteneuer, U., Formstecher, E., Khodjakov, A., and Bornens, M. (2009). hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *J. Cell Biol.* *185*, 101–114.
- Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Jayakody, I., Taketo, M.M., Scherer, G., and Harley, V.R. (2008). Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Dev. Biol.* *314*, 71–83.
- Baillet, A., Mandon-Pépin, B., Cabau, C., Pומרol, E., Pailhoux, E., and Cotinot, C. (2008). Identification of transcripts involved in meiosis and follicle formation during ovine ovary development. *BMC Genomics* *9*, 436.
- Baillet, A., Le Bouffant, R., Volff, J.N., Luangpraseuth, A., Pומרol, E., Thépot, D., Pailhoux, E., Livera, G., Cotinot, C., and Mandon-Pépin, B. (2011a). TOPAZ1, a Novel Germ Cell-Specific Expressed Gene Conserved during Evolution across Vertebrates. *PLoS ONE* *6*, e26950.
- Baillet, A., Le Bouffant, R., Volff, J.N., Luangpraseuth, A., Pומרol, E., Thépot, D., Pailhoux, E., Livera, G., Cotinot, C., and Mandon-Pépin, B. (2011b). TOPAZ1, a Novel Germ Cell-Specific Expressed Gene Conserved during Evolution across Vertebrates. *PLoS ONE* *6*, e26950.
- Baker, P.J., Sha, J.A., McBride, M.W., Peng, L., Payne, A.H., and O'Shaughnessy, P.J. (1999). Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur. J. Biochem.* *260*, 911–917.

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

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

Balaton, B.P., and Brown, C.J. (2016). Escape Artists of the X Chromosome. *Trends Genet.* **32**, 348–359.

Bannister, L.A., Reinholdt, L.G., Munroe, R.J., and Schimenti, J.C. (2004). Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8. *Genesis* **40**, 184–194.

Bao, J., and Bedford, M.T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction* **151**, R55–R70.

Bao, J., Wu, J., Schuster, A.S., Hennig, G.W., and Yan, W. (2013). Expression Profiling Reveals Developmentally Regulated lncRNA Repertoire in the Mouse Male Germline. *Biol. Reprod.* **89**.

Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kist, R., Taketo, M.M., Englert, C., and Scherer, G. (2006). Homozygous Inactivation of Sox9 Causes Complete XY Sex Reversal in Mice. *Biol. Reprod.* **74**, 195–201.

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

Barrionuevo, F.J., Hurtado, A., Kim, G.-J., Real, F.M., Bakkali, M., Kopp, J.L., Sander, M., Scherer, G., Burgos, M., and Jiménez, R. (2016). Sox9 and Sox8 protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. *ELife* **5**, e15635.

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

Barsoum, I.B., Kaur, J., Ge, R.S., Cooke, P.S., and Yao, H.H. (2013). Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *FASEB J.* **27**, 2657–2666.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs. *Cell* **116**, 281–297.

Baudat, F., Manova, K., Yuen, J.P., Jasin, M., and Keeney, S. (2000). Chromosome Synapsis Defects and Sexually Dimorphic Meiotic Progression in Mice Lacking Spo11. *Mol. Cell* **6**, 989–998.

Beermann, J., Piccoli, M.-T., Viereck, J., and Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol. Rev.* **96**, 1297–1325.

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

Beletskii, A., Hong, Y.-K., Pehrson, J., Egholm, M., and Strauss, W.M. (2001). PNA interference mapping demonstrates functional domains in the noncoding RNA Xist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9215–9220.

Bellani, M.A. (2005). SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *J. Cell Sci.* **118**, 3233–3245.

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

- Bellvé, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., and Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* *74*, 68–85.
- Bendel-Stenzel, M.R., Gomperts, M., Anderson, R., Heasman, J., and Wylie, C. (2000). The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech. Dev.* *91*, 143–152.
- Bernard, P., Sim, H., Knowler, K., Vilain, E., and Harley, V. (2008). Human SRY inhibits β -catenin-mediated transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 2889–2900.
- Berndtson, W.E., Igboeli, G., and Pickett, B.W. (1987). Relationship of Absolute Numbers of Sertoli Cells to Testicular Size and Spermatogenesis in Young Beef Bulls. *J. Anim. Sci.* *64*, 241–246.
- Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C., and Panthier, J.J. (1996). Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 3023–3033.
- Bhan, A., Soleimani, M., and Mandal, S.S. (2017). Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res.* *77*, 3965–3981.
- Birk, O.S., Casiano, D.E., Wassif, C.A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J.A., Parker, K.L., *et al.* (2000). The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* *403*, 909–913.
- Bishop, C.E., Whitworth, D.J., Qin, Y., AgoulNIK, A.I., AgoulNIK, I.U., Harrison, W.R., Behringer, R.R., and Overbeek, P.A. (2000). A transgenic insertion upstream of *Sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet.* *26*, 490–494.
- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., and Kleckner, N. (1992). *DMC1*: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* *69*, 439–456.
- Bisig, C.G., Guiraldelli, M.F., Kouznetsova, A., Scherthan, H., Höög, C., Dawson, D.S., and Pezza, R.J. (2012). Synaptonemal Complex Components Persist at Centromeres and Are Required for Homologous Centromere Pairing in Mouse Spermatocytes. *PLoS Genet.* *8*, e1002701.
- Blangy, A., Lane, H.A., d'Hérin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, E.A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* *83*, 1159–1169.
- Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D.G., and Cooke, H.J. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J. Cell Biol.* *176*, 741–747.
- Bolcun-Filas, E., Speed, R., Taggart, M., Grey, C., de Massy, B., Benavente, R., and Cooke, H.J. (2009). Mutation of the Mouse *Syce1* Gene Disrupts Synapsis and Suggests a Link between Synaptonemal Complex Structural Components and DNA Repair. *PLoS Genet.* *5*, e1000393.
- Bolcun-Filas, E., Bannister, L.A., Barash, A., Schimenti, K.J., Hartford, S.A., Eppig, J.J., Handel, M.A., Shen, L., and Schimenti, J.C. (2011). A-MYB (MYBL1) transcription factor is a master regulator of male meiosis. *Development* *138*, 3319–3330.
- Bonaccorsi, S., Giansanti, M.G., and Gatti, M. (1998). Spindle Self-organization and Cytokinesis During Male Meiosis in asterless Mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* *142*, 751–761.

- Bonavita, R., Walas, D., Brown, A.K., Luini, A., Stephens, D.J., and Colanzi, A. (2014). Cep126 is required for pericentriolar satellite localisation to the centrosome and for primary cilium formation. *Biol. Cell* *106*, 254–267.
- Bonnycastle, L.L.C., Yu, C.-E., Hunt, C.R., Trask, B.J., Clancy, K.P., Weber, J.L., Patterson, D., and Schellenberg, G.D. (1994). Cloning, Sequencing, and Mapping of the Human Chromosome 14 Heat Shock Protein Gene (HSPA2). *Genomics* *23*, 85–93.
- Borensztein, M., Syx, L., Ancelin, K., Diabangouaya, P., Picard, C., Liu, T., Liang, J.-B., Vassilev, I., Galupa, R., Servant, N., *et al.* (2017). Xist-dependent imprinted X inactivation and the early developmental consequences of its failure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 226–233.
- Borsani, G., Tonlorenzi, R., Simmler, M.C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Grompe, M., Pizzuti, A., Muzny, D., Lawrence, C., *et al.* (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* *351*, 325–329.
- Boulanger, L., Pannetier, M., Gall, L., Allais-Bonnet, A., Elzaiat, M., Le Bourhis, D., Daniel, N., Richard, C., Cotinot, C., Ghyselinck, N.B., *et al.* (2014). FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr. Biol. CB* *24*, 404–408.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., *et al.* (2006). Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science* *312*, 596–600.
- Bowles, J., Feng, C.-W., Spiller, C., Davidson, T.-L., Jackson, A., and Koopman, P. (2010). FGF9 Suppresses Meiosis and Promotes Male Germ Cell Fate in Mice. *Dev. Cell* *19*, 440–449.
- Bradford, S.T., Wilhelm, D., Bandiera, R., Vidal, V., Schedl, A., and Koopman, P. (2009). A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry in vivo. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 3429–3438.
- Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 28–36.
- Brennan, J., Tilmann, C., and Capel, B. (2003). Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev.* *17*, 800–810.
- Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007). Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell* *128*, 1089–1103.
- Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R.D., and Petukhova, G.V. (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* *485*, 642–645.
- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., Cooper, P., Smith, S., McCabe, V.M., Norris, D.P., Penny, G.D., Patel, D., and Rastan, S. (1991). Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature* *351*, 329–331.
- Broering, T.J., Alavattam, K.G., Sadreyev, R.I., Ichijima, Y., Kato, Y., Hasegawa, K., Camerini-Otero, R.D., Lee, J.T., Andreassen, P.R., and Namekawa, S.H. (2014). BRCA1 establishes DNA damage signaling and pericentric heterochromatin of the X chromosome in male meiosis. *J. Cell Biol.* *205*, 663–675.
- Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., and Willard, H.F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* *349*, 38–44.
- Bucciarelli, E., Giansanti, M.G., Bonaccorsi, S., and Gatti, M. (2003). Spindle assembly and cytokinesis in the absence of chromosomes during *Drosophila* male meiosis. *J. Cell Biol.* *160*, 993–999.

- Buehr, M., McLaren, A., Bartley, A., and Darling, S. (1993). Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. *Dev. Dyn.* 198, 182–189.
- Buzzard, J.J., Wreford, N.G., and Morrison, J.R. (2003). Thyroid Hormone, Retinoic Acid, and Testosterone Suppress Proliferation and Induce Markers of Differentiation in Cultured Rat Sertoli Cells. *Endocrinology* 144, 3722–3731.
- Cabili, M.N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., and Rinn, J.L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 25, 1915–1927.
- Calabrese, J.M., Sun, W., Song, L., Mugford, J.W., Williams, L., Yee, D., Starmer, J., Mieczkowski, P., Crawford, G.E., and Magnuson, T. (2012). Site-Specific Silencing of Regulatory Elements as a Mechanism of X Inactivation. *Cell* 151, 951–963.
- Capel, B., Swain, A., Nicolis, S., Hacker, A., Walter, M., Koopman, P., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1993). Circular transcripts of the testis-determining gene *Sry* in adult mouse testis. *Cell* 73, 1019–1030.
- Carazo-Salas, R.E., Gruss, O.J., Mattaj, I.W., and Karsenti, E. (2001). Ran–GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* 3, 228–234.
- Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc’his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). *MIWI2* Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Dev. Cell* 12, 503–514.
- Caron, N., Veilleux, S., and Boissonneault, G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 437–443.
- Carvalho-Santos, Z., Machado, P., Branco, P., Tavares-Cadete, F., Rodrigues-Martins, A., Pereira-Leal, J.B., and Bettencourt-Dias, M. (2010). Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *J. Cell Sci.* 123, 1414–1426.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922–927.
- Chaboissier, M.-C., Kobayashi, A., Vidal, V.P.I., Lützkendorf, S., Van de Kant, H.J.G., Wegner, M., de Rooij, D.G., Behringer, R.R., and Schedl, A. (2004). Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse. *Development* 131, 1891–1901.
- Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.-C. (2008). Activation of β -catenin signaling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1264–1277.
- Chassot, A.-A., Le Rolle, M., Jolivet, G., Stevant, I., Guigonis, J.-M., Da Silva, F., Nef, S., Pailhoux, E., Schedl, A., Ghyselinck, N.B., *et al.* (2020). Retinoic acid synthesis by *ALDH1A* proteins is dispensable for meiosis initiation in the mouse fetal ovary. *Sci. Adv.* 6, eaaz1261.
- Chauvière, M., Kress, C., and Kress, M. (2008). Disruption of the mitotic kinesin *Eg5* gene (*Knsl1*) results in early embryonic lethality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 513–519.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., and Desai, A. (2006). The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell* 127, 983–997.
- Chen, H.-H., Welling, M., Bloch, D.B., Muñoz, J., Mientjes, E., Chen, X., Tramp, C., Wu, J., Yabuuchi, A., Chou, Y.-F., *et al.* (2014). *DAZL* Limits Pluripotency, Differentiation, and Apoptosis in Developing Primordial Germ Cells. *Stem Cell Rep.* 3, 892–904.

Chen, Y., Liang, P., Huang, Y., Li, M., Zhang, X., Ding, C., Feng, J., Zhang, Z., Zhang, X., Gao, Y., *et al.* (2017). Glycerol kinase-like proteins cooperate with Pld6 in regulating sperm mitochondrial sheath formation and male fertility. *Cell Discov.* **3**, 17030.

Chen, Y., Zheng, Y., Gao, Y., Lin, Z., Yang, S., Wang, T., Wang, Q., Xie, N., Hua, R., Liu, M., *et al.* (2018). Single-cell RNA-seq uncovers dynamic processes and critical regulators in mouse spermatogenesis. *Cell Res.* **28**, 879–896.

Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.-C., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* **28**, 82–86.

Chu, C., Qu, K., Zhong, F.L., Artandi, S.E., and Chang, H.Y. (2011). Genomic Maps of Long Noncoding RNA Occupancy Reveal Principles of RNA-Chromatin Interactions. *Mol. Cell* **44**, 667–678.

Chu, C., Zhang, Q.C., da Rocha, S.T., Flynn, R.A., Bharadwaj, M., Calabrese, J.M., Magnuson, T., Heard, E., and Chang, H.Y. (2015). Systematic Discovery of Xist RNA Binding Proteins. *Cell* **161**, 404–416.

Chureau, C., Prissette, M., Bourdet, A., Barbe, V., Cattolico, L., Jones, L., Eggen, A., Avner, P., and Duret, L. (2002). Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine. *Genome Res.* **12**, 894–908.

Chureau, C., Chantalat, S., Romito, A., Galvani, A., Duret, L., Avner, P., and Rougeulle, C. (2011). Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 705–718.

Cizmecioglu, O., Arnold, M., Bahtz, R., Settele, F., Ehret, L., Haselmann-Weiß, U., Antony, C., and Hoffmann, I. (2010). Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome. *J. Cell Biol.* **191**, 731–739.

Clark, A.M., Garland, K.K., and Russell, L.D. (2000). Desert hedgehog (Dhh) Gene Is Required in the Mouse Testis for Formation of Adult-Type Leydig Cells and Normal Development of Peritubular Cells and Seminiferous Tubules. *Biol. Reprod.* **63**, 1825–1838.

Clemson, C.M., Hutchinson, J.N., Sara, S.A., Ensminger, A.W., Fox, A.H., Chess, A., and Lawrence, J.B. (2009). An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles. *Mol. Cell* **33**, 717–726.

Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* **52**, 198–236.

Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B., and Ornitz, D.M. (2001). Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9. *Cell* **104**, 875–889.

Combes, A.N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., and Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev. Biol.* **326**, 112–120.

Conduit, P.T., Wainman, A., and Raff, J.W. (2015). Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 611–624.

Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W. (2005). The Nuclear Form of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Is a Protein Thiol Peroxidase Contributing to Sperm Chromatin Stability. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7637–7644.

Conrads, T.P., Tocci, G.M., Hood, B.L., Zhang, C.-O., Guo, L., Koch, K.R., Michejda, C.J., Veenstra, T.D., and Keay, S.K. (2006). CKAP4/p63 is a receptor for the frizzled-8 protein-related antiproliferative factor from interstitial cystitis patients. *J. Biol. Chem.* **281**, 37836–37843.

- Cooke, P.S., and Meisami, E. (1991). Early Hypothyroidism in Rats Causes Increased Adult Testis and Reproductive Organ Size but Does Not Change Testosterone Levels*. *Endocrinology* *129*, 237–243.
- Cool, J., Carmona, F.D., Szucsik, J.C., and Capel, B. (2008). Peritubular Myoid Cells Are Not the Migrating Population Required for Testis Cord Formation in the XY Gonad. *Sex. Dev.* *2*, 128–133.
- Cool, J., DeFalco, T.J., and Capel, B. (2011). Vascular-mesenchymal cross-talk through Vegf and Pdgf drives organ patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 167–172.
- Cooper, T.G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J. Androl.* *13*, 130–138.
- Costa, Y., Speed, R., Ollinger, R., Alsheimer, M., Semple, C.A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Höög, C., Benavente, R., *et al.* (2005). Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J. Cell Sci.* *118*, 2755–2762.
- Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., and Pandolfi, P.P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* *36*, 653–659.
- Coveney, D., Cool, J., Oliver, T., and Capel, B. (2008). Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ, the gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 7212–7217.
- Cui, S., Ross, A., Stallings, N., Parker, K.L., Capel, B., and Quaggin, S.E. (2004). Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development* *131*, 4095–4105.
- Czech, B., Munafò, M., Ciabrelli, F., Eastwood, E.L., Fabry, M.H., Kneuss, E., and Hannon, G.J. (2018). piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. *Annu. Rev. Genet.* *52*, 131–157.
- Dam, A.H.D.M., Feenstra, I., Westphal, J.R., Ramos, L., van Golde, R.J.T., and Kremer, J.A.M. (2007). Globozoospermia revisited. *Hum. Reprod. Update* *13*, 63–75.
- Darde, T.A., Sallou, O., Becker, E., Evrard, B., Monjeaud, C., Le Bras, Y., Jégou, B., Collin, O., Rolland, A.D., and Chalmel, F. (2015). The ReproGenomics Viewer: an integrative cross-species toolbox for the reproductive science community. *Nucleic Acids Res.* *43*, W109-116.
- Darde, T.A., Lecluze, E., Lardenois, A., Stévant, I., Alary, N., Tüttelmann, F., Collin, O., Nef, S., Jégou, B., Rolland, A.D., *et al.* (2019). The ReproGenomics Viewer: a multi-omics and cross-species resource compatible with single-cell studies for the reproductive science community. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *35*, 3133–3139.
- De Felici, M. (2016). The Formation and Migration of Primordial Germ Cells in Mouse and Man. In *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*, R.P. Pipek, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 23–46.
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., and Berta, P. (1998). Direct Interaction of SRY-Related Protein SOX9 and Steroidogenic Factor 1 Regulates Transcription of the Human Anti-Müllerian Hormone Gene. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6653–6665.
- DeFalco, T., Takahashi, S., and Capel, B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev. Biol.* *352*, 14–26.
- Degtyarev, M., De Mazière, A., Orr, C., Lin, J., Lee, B.B., Tien, J.Y., Prior, W.W., van Dijk, S., Wu, H., Gray, D.C., *et al.* (2008). Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J. Cell Biol.* *183*, 101–116.

- Delphin, C., Bouvier, D., Seggio, M., Couriol, E., Saoudi, Y., Denarier, E., Bosc, C., Valiron, O., Bisbal, M., Arnal, I., *et al.* (2012). MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *J. Biol. Chem.* *287*, 35127–35138.
- Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a Murine Homolog of piwi, Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis. *Dev. Cell* *2*, 819–830.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., *et al.* (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* *22*, 1775–1789.
- Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M., and Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 13612–13617.
- DiNapoli, L., Batchvarov, J., and Capel, B. (2006). FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development* *133*, 1519–1527.
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., and Han, M. (2007). SUN1 Is Required for Telomere Attachment to Nuclear Envelope and Gametogenesis in Mice. *Dev. Cell* *12*, 863–872.
- Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Poorman-Allen, P., Mori, C., Blizard, D.R., Brown, P.R., Goulding, E.H., Strong, B.D., and Eddy, E.M. (1997). HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 4595–4603.
- Drabent, B., Bode, C., Bramlage, B., and Doenecke, D. (1996). Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem. Cell Biol.* *106*, 247–251.
- Dunleavy, J.E.M., O’Bryan, M.K., Stanton, P.G., and O’Donnell, L. (2019). The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction* R53–R72.
- Dym, M., Kokkinaki, M., and He, Z. (2009). Spermatogonial stem cells: Mouse and human comparisons. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *87*, 27–34.
- Eaker, S., Cobb, J., Pyle, A., and Handel, M.A. (2002). Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. *Dev. Biol.* *249*, 85–95.
- Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E., and Heyting, C. (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1 β and SMC3. *J. Cell Biol.* *160*, 657–670.
- Elzaiat, M., Jouneau, L., Thépot, D., Klopp, C., Allais-Bonnet, A., Cabau, C., André, M., Chaffaux, S., Crihiu, E.-P., Pailhoux, E., *et al.* (2014). High-Throughput Sequencing Analyses of XX Genital Ridges Lacking FOXL2 Reveal DMRT1 Up-Regulation Before SOX9 Expression During the Sex-Reversal Process in Goats1. *Biol. Reprod.* *91*.
- Endo, T., Mikedis, M.M., Nicholls, P.K., Page, D.C., and de Rooij, D.G. (2019). Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules* *9*, 775.
- Escalante-Alcalde, D., and Merchant-Larios, H. (1992). Somatic and germ cell interactions during histogenetic aggregation of mouse fetal testes. *Exp. Cell Res.* *198*, 150–158.
- Escalier, D. (2006). Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum. Reprod. Update* *12*, 449–461.

- Ferenz, N.P., Gable, A., and Wadsworth, P. (2010). Mitotic functions of kinesin-5. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 255–259.
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX Is Required for Chromatin Remodeling and Inactivation of Sex Chromosomes in Male Mouse Meiosis. *Dev. Cell* *4*, 497–508.
- Filipponi, D., Hobbs, R.M., Ottolenghi, S., Rossi, P., Jannini, E.A., Pandolfi, P.P., and Dolci, S. (2007). Repression of kit Expression by Plzf in Germ Cells. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 6770–6781.
- Fischer, J.M., Dudley, S., Miller, A.J., and Liskay, R.M. (2016). An intact Pms2 ATPase domain is not essential for male fertility. *DNA Repair* *39*, 46–51.
- Fitzpatrick, G.V., Soloway, P.D., and Higgins, M.J. (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat. Genet.* *32*, 426–431.
- Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanović, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., Goodfellow, P.N., *et al.* (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* *372*, 525–530.
- Fox, A.H., and Lamond, A.I. (2010). Paraspeckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000687–a000687.
- Frost, R.J.A., Hamra, F.K., Richardson, J.A., Qi, X., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2010). MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11847–11852.
- Gabory, A., Ripoche, M.-A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyat, A., Forne, T., Jammes, H., Ainscough, J.F.X., Surani, M.A., Journot, L., *et al.* (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development* *136*, 3413–3421.
- Ganesan, G., and Rao, S.M.R. (2008). A novel noncoding RNA processed by Drosha is restricted to nucleus in mouse. *RNA* *14*, 1399–1410.
- Gasca, S., Canizares, J., de Santa Barbara, P., Mejean, C., Poulat, F., Berta, P., and Boizet-Bonhoure, B. (2002). A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 11199–11204.
- Gatti, M., Bucciarelli, E., Lattaio, R., Pellacani, C., Mottier-Pavie, V., Giansanti, M.G., Somma, M.P., and Bonaccorsi, S. (2012). The relative roles of centrosomal and kinetochore-driven microtubules in *Drosophila* spindle formation. *Exp. Cell Res.* *318*, 1375–1380.
- Gayen, S., Maclary, E., Buttigieg, E., Hinten, M., and Kalantry, S. (2015). A Primary Role for the Tsix lncRNA in Maintaining Random X-Chromosome Inactivation. *Cell Rep.* *11*, 1251–1265.
- Ge, R.-S., Dong, Q., Sottas, C.M., Papadopoulos, V., Zirkin, B.R., and Hardy, M.P. (2006). In search of rat stem Leydig cells: Identification, isolation, and lineage-specific development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 2719–2724.
- Gelfand, B., Mead, J., Bruning, A., Apostolopoulos, N., Tadigotla, V., Nagaraj, V., Sengupta, A.M., and Vershon, A.K. (2011). Regulated antisense transcription controls expression of cell-type-specific genes in yeast. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1701–1709.
- Gely-Pernot, A., Raverdeau, M., Célébi, C., Dennefeld, C., Feret, B., Klopfenstein, M., Yoshida, S., Ghyselinck, N.B., and Mark, M. (2012). Spermatogonia Differentiation Requires Retinoic Acid Receptor γ . *Endocrinology* *153*, 438–449.

- Gendrel, A.-V., and Heard, E. (2014). Noncoding RNAs and Epigenetic Mechanisms During X-Chromosome Inactivation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 561–580.
- Geng, Y., Xie, S., Li, Q., Ma, J., and Wang, G. (2011). Large Intervening Non-Coding RNA HOTAIR is Associated with Hepatocellular Carcinoma Progression. *J. Int. Med. Res.* *39*, 2119–2128.
- Gervasi, M.G., and Visconti, P.E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* *5*, 204–218.
- Geyer, C.B., Inselman, A.L., Sunman, J.A., Bornstein, S., Handel, M.A., and Eddy, E.M. (2009). A missense mutation in the Capza3 gene and disruption of F-actin organization in spermatids of repro32 infertile male mice. *Dev. Biol.* *330*, 142–152.
- Giansanti, M.G., Bucciarelli, E., Bonaccorsi, S., and Gatti, M. (2008). Drosophila SPD-2 Is an Essential Centriole Component Required for PCM Recruitment and Astral-Microtubule Nucleation. *Curr. Biol.* *18*, 303–309.
- Gill, M.E., Hu, Y.-C., Lin, Y., and Page, D.C. (2011). Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 7443–7448.
- Ginsburg, M., Snow, M.H., and McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* *110*, 521–528.
- Giulii, G., Shen, W.H., and Ingraham, H.A. (1997). The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 1799–1807.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* *391*, 357–362.
- Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C., Karlsson, L., and Betsholtz, C. (2000). Leydig Cell Loss and Spermatogenic Arrest in Platelet-Derived Growth Factor (Pdgf)-a-Deficient Mice. *J. Cell Biol.* *149*, 1019–1026.
- Gombos, L., Neuner, A., Berynsky, M., Fava, L.L., Wade, R.C., Sachse, C., and Schiebel, E. (2013). GTP regulates the microtubule nucleation activity of γ -tubulin. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1317–1327.
- Gomes, E.R., Jani, S., and Gundersen, G.G. (2005). Nuclear Movement Regulated by Cdc42, MRCK, Myosin, and Actin Flow Establishes MTOC Polarization in Migrating Cells. *Cell* *121*, 451–463.
- Gomez-Ferreria, M.A., Rath, U., Buster, D.W., Chanda, S.K., Caldwell, J.S., Rines, D.R., and Sharp, D.J. (2007). Human Cep192 Is Required for Mitotic Centrosome and Spindle Assembly. *Curr. Biol.* *17*, 1960–1966.
- Gomperts, M., Garcia-Castro, M., Wylie, C., and Heasman, J. (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 135–141.
- Gonen, N., Quinn, A., O'Neill, H.C., Koopman, P., and Lovell-Badge, R. (2017). Normal Levels of Sox9 Expression in the Developing Mouse Testis Depend on the TES/TESCO Enhancer, but This Does Not Act Alone. *PLOS Genet.* *13*, e1006520.
- Gonen, N., Futtner, C.R., Wood, S., Garcia-Moreno, S.A., Salamone, I.M., Samson, S.C., Sekido, R., Poulat, F., Maatouk, D.M., and Lovell-Badge, R. (2018). Sex reversal following deletion of a single distal enhancer of Sox9. *Science* *360*, 1469–1473.
- Goodarzi, H., Liu, X., Nguyen, H.C.B., Zhang, S., Fish, L., and Tavazoie, S.F. (2015). Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement. *Cell* *161*, 790–802.

- Gopinathan, L., Szmyd, R., Low, D., Diril, M.K., Chang, H.-Y., Coppola, V., Liu, K., Tessarollo, L., Guccione, E., van Pelt, A.M.M., *et al.* (2017). Emi2 Is Essential for Mouse Spermatogenesis. *Cell Rep.* *20*, 697–708.
- Griswold, M.D. (1988). Protein Secretions of Sertoli Cells. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 133–156.
- Gu, Y., Runyan, C., Shoemaker, A., Surani, A., and Wylie, C. (2009). Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development* *136*, 1295–1303.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* *346*, 245–250.
- Gupta, N., Manevich, Y., Kazi, A.S., Tao, J.-Q., Fisher, A.B., and Bates, S.R. (2006). Identification and characterization of p63 (CKAP4/ERGIC-63/CLIMP-63), a surfactant protein A binding protein, on type II pneumocytes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *291*, L436–446.
- Gupta, R.A., Shah, N., Wang, K.C., Kim, J., Horlings, H.M., Wong, D.J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J.L., *et al.* (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* *464*, 1071–1076.
- Guttman, J.A., Takai, Y., and Vogl, A.W. (2004). Evidence that tubulobulbar complexes in the seminiferous epithelium are involved with internalization of adhesion junctions. *Biol. Reprod.* *71*, 548–559.
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P., *et al.* (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* *458*, 223–227.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014a). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 509–524.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014b). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 509–524.
- Ha, H., Song, J., Wang, S., Kapusta, A., Feschotte, C., Chen, K.C., and Xing, J. (2014). A comprehensive analysis of piRNAs from adult human testis and their relationship with genes and mobile elements. *BMC Genomics* *15*, 545.
- van Haaster, L.H., de Jong, F.H., Docter, R., and de Rooij, D.G. (1993). High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology* *133*, 755–760.
- Habedanck, R., Stierhof, Y.-D., Wilkinson, C.J., and Nigg, E.A. (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1140–1146.
- Habu, T., Taki, T., West, A., Nishimune, Y., and Morita, T. (1996). The Mouse and Human Homologs of DMC1, the Yeast Meiosis-Specific Homologous Recombination Gene, Have a Common Unique form of Exon-Skipped Transcript in Meiosis. *Nucleic Acids Res.* *24*, 470–477.
- Hached, K., Xie, S.Z., Buffin, E., Cladiere, D., Rachez, C., Sacras, M., Sorger, P.K., and Wassmann, K. (2011). Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* *138*, 2261–2271.
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 1603–1614.

- Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., and He, Z. (2014). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *29*, 66–75.
- Haider, S.G. (2004). Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 181–241.
- Hall, T.M.T. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *15*, 367–373.
- Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R., and Höög, C. (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J. Cell Sci.* *119*, 4025–4032.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* *18*, 3016–3027.
- Hanley, N.A., Hagan, D.M., Clement-Jones, M., Ball, S.G., Strachan, T., Salas-Cortés, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., *et al.* (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* *91*, 403–407.
- Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* *495*, 384–388.
- Hao, S.-L., Ni, F.-D., and Yang, W.-X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* *706*, 201–210.
- Hardy, M.P., Kelce, W.R., Klinefelter, G.R., and Ewing, L.L. (1990). Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* *127*, 488–490.
- Haren, L., Remy, M.-H., Bazin, I., Callebaut, I., Wright, M., and Merdes, A. (2006). NEDD1-dependent recruitment of the γ -tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *J. Cell Biol.* *172*, 505–515.
- Harley, V.R., Clarkson, M.J., and Argentaro, A. (2003). The Molecular Action and Regulation of the Testis-Determining Factors, SRY (Sex-Determining Region on the Y Chromosome) and SOX9 [SRY-Related High-Mobility Group (HMG) Box 9]. *Endocr. Rev.* *24*, 466–487.
- Hatch, E.M., Kulukian, A., Holland, A.J., Cleveland, D.W., and Stearns, T. (2010). Cep152 interacts with Plk4 and is required for centriole duplication. *J. Cell Biol.* *191*, 721–729.
- Hauf, S., and Watanabe, Y. (2004). Kinetochores orientation in mitosis and meiosis. *Cell* *119*, 317–327.
- Hayashi, K., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Kaneda, M., Tang, F., Hajkova, P., Lao, K., O’Carroll, D., Das, P.P., Tarakhovskiy, A., Miska, E.A., *et al.* (2008). MicroRNA Biogenesis Is Required for Mouse Primordial Germ Cell Development and Spermatogenesis. *PLoS ONE* *3*, e1738.
- Heckert, L., and Griswold, M.D. (1993). Expression of the FSH Receptor in the Testis. In *Recent Progress in Hormone Research*, (Elsevier), pp. 61–77.
- Hedger, M.P. (2002). Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J. Reprod. Immunol.* *57*, 19–34.
- Helmke, K.J., Heald, R., and Wilbur, J.D. (2013). Interplay Between Spindle Architecture and Function. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 83–125.
- Herrán, Y., Gutiérrez-Caballero, C., Sánchez-Martín, M., Hernández, T., Viera, A., Barbero, J.L., de Álava, E., de Rooij, D.G., Suja, J.Á., Llano, E., *et al.* (2011). The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J.* *30*, 3091–3105.

- Herzing, L.B.K., Romer, J.T., Horn, J.M., and Ashworth, A. (1997). Xist has properties of the X-chromosome inactivation centre. *Nature* 386, 272–275.
- Hess, R.A., and Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636, 1–15.
- Hobbs, R.M., Fagoonee, S., Papa, A., Webster, K., Altruda, F., Nishinakamura, R., Chai, L., and Pandolfi, P.P. (2012). Functional Antagonism between Sall4 and Plzf Defines Germline Progenitors. *Cell Stem Cell* 10, 284–298.
- Hodges, C.A., Revenkova, E., Jessberger, R., Hassold, T.J., and Hunt, P.A. (2005). SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat. Genet.* 37, 1351–1355.
- Hodges, M.E., Scheumann, N., Wickstead, B., Langdale, J.A., and Gull, K. (2010). Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *J. Cell Sci.* 123, 1407–1413.
- Holmfeldt, P. (2003). Interphase and monoastral-mitotic phenotypes of overexpressed MAP4 are modulated by free tubulin concentrations. *J. Cell Sci.* 116, 3701–3711.
- Hongay, C.F., and Orr-Weaver, T.L. (2011). Drosophila Inducer of MEiosis 4 (IME4) is required for Notch signaling during oogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 14855–14860.
- Hopkins, J., Hwang, G., Jacob, J., Sapp, N., Bedigian, R., Oka, K., Overbeek, P., Murray, S., and Jordan, P.W. (2014). Meiosis-Specific Cohesin Component, Stag3 Is Essential for Maintaining Centromere Chromatid Cohesion, and Required for DNA Repair and Synapsis between Homologous Chromosomes. *PLoS Genet.* 10, e1004413.
- Horn, H.F., Kim, D.I., Wright, G.D., Wong, E.S.M., Stewart, C.L., Burke, B., and Roux, K.J. (2013). A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 202, 1023–1039.
- Hu, Y.-C., Okumura, L.M., and Page, D.C. (2013). Gata4 Is Required for Formation of the Genital Ridge in Mice. *PLoS Genet.* 9, e1003629.
- Huang, W.-P., and Ho, H.-C. (2006). Role of microtubule-dependent membrane trafficking in acrosomal biogenesis. *Cell Tissue Res.* 323, 495–503.
- Huang, B., Wang, S., Ning, Y., Lamb, A.N., and Bartley, J. (1999). Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am. J. Med. Genet.* 87, 349–353.
- Huang, W., Cao, Z., Zhang, J., Ji, Q., and Li, Y. (2019). Aflatoxin B1 promotes autophagy associated with oxidative stress-related PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in mice testis. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 255, 113317.
- Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat. Med.* 21, 1253–1261.
- Hunt, P.A., and Hassold, T.J. (2002). Sex matters in meiosis. *Science* 296, 2181–2183.
- Hutvagner, G. (2001). A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science* 293, 834–838.
- Ichijima, Y., Ichijima, M., Lou, Z., Nussenzweig, A., Camerini-Otero, R.D., Chen, J., Andreassen, P.R., and Namekawa, S.H. (2011). MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells. *Genes Dev.* 25, 959–971.
- Ikeda, Y. (1996). SF-1: A key regulator of development and function in the mammalian reproductive system. *Pediatr. Int.* 38, 412–419.

- Ikeda, Y., Shen, W.H., Ingraham, H.A., and Parker, K.L. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* *8*, 654–662.
- Ishiguro, K.-I. (2019). The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *24*, 6–30.
- Ishikawa, T. (2017). Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *9*, a028076.
- Jacobs, P.A., and Ross, A. (1966). Structural Abnormalities of the Y Chromosome in Man. *Nature* *210*, 352–354.
- Jacobs, P.A., and Strong, J.A. (1959). A Case of Human Intersexuality Having a Possible XXY Sex-Determining Mechanism. *Nature* *183*, 302–303.
- Jain, A.K., Xi, Y., McCarthy, R., Allton, K., Akdemir, K.C., Patel, L.R., Aronow, B., Lin, C., Li, W., Yang, L., *et al.* (2016). LncPRESS1 Is a p53-Regulated LncRNA that Safeguards Pluripotency by Disrupting SIRT6-Mediated De-acetylation of Histone H3K56. *Mol. Cell* *64*, 967–981.
- Jan, S.Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M., and Vormer, T.L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1822*, 1838–1850.
- Jeanes, A., Wilhelm, D., Wilson, M.J., Bowles, J., McClive, P.J., Sinclair, A.H., and Koopman, P. (2005). Evaluation of candidate markers for the peritubular myoid cell lineage in the developing mouse testis. *Reproduction* *130*, 509–516.
- Jeck, W.R., Sorrentino, J.A., Wang, K., Slevin, M.K., Burd, C.E., Liu, J., Marzluff, W.F., and Sharpless, N.E. (2013). Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* *19*, 141–157.
- Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S.P., Zhao, L., de Rooij, D.G., Themmen, A.P.N., Behringer, R.R., and Parker, K.L. (2004). Cell-Specific Knockout of Steroidogenic Factor 1 Reveals Its Essential Roles in Gonadal Function. *Mol. Endocrinol.* *18*, 1610–1619.
- Johnson, L., Zane, R.S., Petty, C.S., and Naves, W.B. (1984). Quantification of the Human Sertoli Cell Population: Its Distribution, Relation to Germ Cell Numbers, and Age-Related Decline¹. *Biol. Reprod.* *31*, 785–795.
- Johnston, C.M., Newall, A.E.T., Brockdorff, N., and Nesterova, T.B. (2002). Enox, a Novel Gene That Maps 10 kb Upstream of Xist and Partially Escapes X Inactivation. *Genomics* *80*, 236–244.
- Jones, R.C., and Murdoch, R.N. (1996). Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* *8*, 553–568.
- Jordan, B.K., Mohammed, M., Ching, S.T., Délot, E., Chen, X.-N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P.N., Elejalde, B.R., and Vilain, E. (2001). Up-Regulation of WNT-4 Signaling and Dosage-Sensitive Sex Reversal in Humans. *Am. J. Hum. Genet.* *68*, 1102–1109.
- Jost, A. (1950). [Degeneration of extremities of rat fetus under the action of certain hypophyseal preparations]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* *144*, 1324–1327.
- Judis, L., Chan, E.R., Schwartz, S., Seftel, A., and Hassold, T. (2004). Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. *Fertil. Steril.* *81*, 205–209.
- Juliano, C., Wang, J., and Lin, H. (2011). Uniting Germline and Stem Cells: The Function of Piwi Proteins and the piRNA Pathway in Diverse Organisms. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 447–469.
- Kaftanovskaya, E.M., Lopez, C., Ferguson, L., Myhr, C., and Agoulnik, A.I. (2015). Genetic ablation of androgen receptor signaling in fetal Leydig cell lineage affects Leydig cell functions in adult testis. *FASEB J.* *29*, 2327–2337.

- Kaláb, P., Pralle, A., Isacoff, E.Y., Heald, R., and Weis, K. (2006). Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* *440*, 697–701.
- Kanduri, C. (2011). *Kcnq1ot1*: A chromatin regulatory RNA. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 343–350.
- Kapusta, A., Kronenberg, Z., Lynch, V.J., Zhuo, X., Ramsay, L., Bourque, G., Yandell, M., and Feschotte, C. (2013). Transposable Elements Are Major Contributors to the Origin, Diversification, and Regulation of Vertebrate Long Noncoding RNAs. *PLoS Genet.* *9*, e1003470.
- Karl, J., and Capel, B. (1998). Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium. *Dev. Biol.* *203*, 323–333.
- Kashihara, H., Chiba, S., Kanno, S.-I., Suzuki, K., Yano, T., and Tsukita, S. (2019). Cep128 associates with Odf2 to form the subdistal appendage of the centriole. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *24*, 231–243.
- Kashimada, K., Svingen, T., Feng, C., Pelosi, E., Bagheri-Fam, S., Harley, V.R., Schlessinger, D., Bowles, J., and Koopman, P. (2011). Antagonistic regulation of *Cyp26b1* by transcription factors SOX9/SF1 and FOXL2 during gonadal development in mice. *FASEB J.* *25*, 3561–3569.
- Kataruka, S., Akhade, V.S., Kayyar, B., and Rao, M.R.S. (2017). *Mrhl* Long Noncoding RNA Mediates Meiotic Commitment of Mouse Spermatogonial Cells by Regulating Sox8 Expression. *Mol. Cell. Biol.* *37*, e00632-16, e00632-16.
- Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M., and Sasaki, H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 2272–2280.
- Kato, Y., Katsuki, T., Kokubo, H., Masuda, A., and Saga, Y. (2016). *Dazl* is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. *Nat. Commun.* *7*, 11272.
- Katoh-Fukui, Y., Owaki, A., Toyama, Y., Kusaka, M., Shinohara, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., and Morohashi, K.-I. (2005). Mouse Polycomb M33 is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating Ad4BP/SF1 expression. *Blood* *106*, 1612–1620.
- Katoh-Fukui, Y., Miyabayashi, K., Komatsu, T., Owaki, A., Baba, T., Shima, Y., Kidokoro, T., Kanai, Y., Schedl, A., Wilhelm, D., *et al.* (2012). *Cbx2*, a Polycomb Group Gene, Is Required for *Sry* Gene Expression in Mice. *Endocrinology* *153*, 913–924.
- Kaur, G., Thompson, L.A., and Dufour, J.M. (2014). Sertoli cells – Immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *30*, 36–44.
- Kelley, D., and Rinn, J. (2012). Transposable elements reveal a stem cell-specific class of long noncoding RNAs. *Genome Biol.* *13*, R107.
- Kelly, A.E., Sampath, S.C., Maniar, T.A., Woo, E.M., Chait, B.T., and Funabiki, H. (2007). Chromosomal Enrichment and Activation of the Aurora B Pathway Are Coupled to Spatially Regulate Spindle Assembly. *Dev. Cell* *12*, 31–43.
- Kerr, G.E., Young, J.C., Horvay, K., Abud, H.E., and Loveland, K.L. (2014). Regulated Wnt/beta-catenin signaling sustains adult spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* *90*, 3.
- Khodjakov, A., Copenagle, L., Gordon, M.B., Compton, D.A., and Kapoor, T.M. (2003). Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. *J. Cell Biol.* *160*, 671–683.
- Kierszenbaum, A.L., and Tres, L.L. (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* *67*, 271–284.

- Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E., and Tres, L.L. (2003). Acroplaxome, an F-Actin–Keratin-containing Plate, Anchors the Acrosome to the Nucleus during Shaping of the Spermatid Head. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4628–4640.
- Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E., and Tres, L.L. (2011). Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis* *1*, 221–230.
- Kim, G.-J., Sock, E., Buchberger, A., Just, W., Denzer, F., Hoepffner, W., German, J., Cole, T., Mann, J., Seguin, J.H., *et al.* (2015a). Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of *SOX9* causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development. *J. Med. Genet.* *52*, 240–247.
- Kim, J., Ishiguro, K., Nambu, A., Akiyoshi, B., Yokobayashi, S., Kagami, A., Ishiguro, T., Pendas, A.M., Takeda, N., Sakakibara, Y., *et al.* (2015b). Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* *517*, 466–471.
- Kim, K., Jutooru, I., Chadalapaka, G., Johnson, G., Frank, J., Burghardt, R., Kim, S., and Safe, S. (2013a). HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene* *32*, 1616–1625.
- Kim, T.-S., Park, J.-E., Shukla, A., Choi, S., Murugan, R.N., Lee, J.H., Ahn, M., Rhee, K., Bang, J.K., Kim, B.Y., *et al.* (2013b). Hierarchical recruitment of Plk4 and regulation of centriole biogenesis by two centrosomal scaffolds, Cep192 and Cep152. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E4849–E4857.
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination. *PLoS Biol.* *4*, e187.
- Kim, Y., Bingham, N., Sekido, R., Parker, K.L., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2007). Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 16558–16563.
- Kimura, H., Fumoto, K., Shojima, K., Nojima, S., Osugi, Y., Tomihara, H., Eguchi, H., Shintani, Y., Endo, H., Inoue, M., *et al.* (2016). CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression. *J. Clin. Invest.* *126*, 2689–2705.
- Kishimoto, T. (2015). Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF. *Chromosoma* *124*, 417–428.
- Kitagawa, D., Vakonakis, I., Olieric, N., Hilbert, M., Keller, D., Olieric, V., Bortfeld, M., Erat, M.C., Flückiger, I., Gönczy, P., *et al.* (2011). Structural Basis of the 9-Fold Symmetry of Centrioles. *Cell* *144*, 364–375.
- Kitamura, K., Yanazawa, M., Sugiyama, N., Miura, H., Iizuka-Kogo, A., Kusaka, M., Omichi, K., Suzuki, R., Kato-Fukui, Y., Kamiirisa, K., *et al.* (2002). Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat. Genet.* *32*, 359–369.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B., Michaelis, C., Nairz, K., and Nasmyth, K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* *98*, 91–103.
- Kneitz, B., Cohen, P.E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M.F., Hou, H., Kolodner, R.D., Kucherlapati, R., Pollard, J.W., and Edelman, W. (2000). MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev.* *14*, 1085–1097.

- Knower, K.C., Kelly, S., Ludbrook, L.M., Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Sekido, R., Lovell-Badge, R., and Harley, V.R. (2011). Failure of SOX9 Regulation in 46XY Disorders of Sex Development with SRY, SOX9 and SF1 Mutations. *PLoS ONE* 6, e17751.
- Koerner, M.V., Pauler, F.M., Huang, R., and Barlow, D.P. (2009). The function of non-coding RNAs in genomic imprinting. *Development* 136, 1771–1783.
- Kolas, N.K., Svetlanov, A., Lenzi, M.L., Macaluso, F.P., Lipkin, S.M., Liskay, R.M., Grealley, J., Edlmann, W., and Cohen, P.E. (2005). Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I. *J. Cell Biol.* 171, 447–458.
- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348, 450–452.
- Koopman, P., Ashworth, A., and Lovellbadge, R. (1991). The ZFY gene family in humans and mice. *Trends Genet.* 7, 132–136.
- Kotaja, N., Bhattacharyya, S.N., Jaskiewicz, L., Kimmins, S., Parvinen, M., Filipowicz, W., and Sassone-Corsi, P. (2006). The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2647–2652.
- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2474–2479.
- Krawczyk, M., and Emerson, B.M. (2014). p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF-κB complexes. *ELife* 3, e01776.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679–691.
- Kuramochi-Miyagawa, S. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131, 839–849.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., *et al.* (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22, 908–917.
- Kurihara, M., Otsuka, K., Matsubara, S., Shiraishi, A., Satake, H., and Kimura, A.P. (2017). A Testis-Specific Long Non-Coding RNA, IncRNA-Tcam1, Regulates Immune-Related Genes in Mouse Male Germ Cells. *Front. Endocrinol.* 8, 299.
- Kusaka, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Miyabayashi, K., Baba, T., Shima, Y., Sugiyama, N., Sugimoto, Y., Okuno, Y., Kodama, R., *et al.* (2010). Abnormal Epithelial Cell Polarity and Ectopic Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression Induced in Emx2 KO Embryonic Gonads. *Endocrinology* 151, 5893–5904.
- La, H.M., and Hobbs, R.M. (2019). Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 76, 4071–4102.
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., and Reik, W. (2003). Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 35, 88–93.
- Latos, P.A., Pauler, F.M., Koerner, M.V., Senergin, H.B., Hudson, Q.J., Stocsits, R.R., Allhoff, W., Stricker, S.H., Klement, R.M., Warczok, K.E., *et al.* (2012). Airn Transcriptional Overlap, But Not Its lncRNA Products, Induces Imprinted Igf2r Silencing. *Science* 338, 1469–1472.

- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., and Hogan, B.L.M. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* *13*, 424–436.
- Ledig, S., Hiort, O., Wunsch, L., and Wieacker, P. (2012). Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *Eur. J. Endocrinol.* *167*, 119–124.
- Leduc, F., Maquennehan, V., Nkoma, G.B., and Boissonneault, G. (2008). DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol. Reprod.* *78*, 324–332.
- Lee, J., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat. Genet.* *21*, 400–404.
- Lee, J.T., Strauss, W.M., Dausman, J.A., and Jaenisch, R. (1996). A 450 kb Transgene Displays Properties of the Mammalian X-Inactivation Center. *Cell* *86*, 83–94.
- Lee, T.-L., Xiao, A., and Rennert, O.M. (2012). Identification of Novel Long Noncoding RNA Transcripts in Male Germ Cells. In *Germline Development*, W.-Y. Chan, and L.A. Blomberg, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 105–114.
- Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A., and Dutta, A. (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev.* *23*, 2639–2649.
- Lei, N., Hornbaker, K.I., Rice, D.A., Karpova, T., Agbor, V.A., and Heckert, L.L. (2007). Sex-Specific Differences in Mouse DMRT1 Expression Are Both Cell Type- and Stage-Dependent During Gonad Development1. *Biol. Reprod.* *77*, 466–475.
- Lemons, D., and McGinnis, W. (2006). Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* *313*, 1918–1922.
- Lewis, A., Green, K., Dawson, C., Redrup, L., Huynh, K.D., Lee, J.T., Hemberger, M., and Reik, W. (2006). Epigenetic dynamics of the Kcnq1 imprinted domain in the early embryo. *Development* *133*, 4203–4210.
- Li, K., Xu, J., Luo, Y., Zou, D., Han, R., Zhong, S., Zhao, Q., Mang, X., Li, M., Si, Y., *et al.* (2020). Panoramic transcriptome analysis and functional screening of long noncoding RNAs in mouse spermatogenesis. *Genome Res.* genome;gr.264333.120v1.
- Li, K., Xu, J., Luo, Y., Zou, D., Han, R., Zhong, S., Zhao, Q., Mang, X., Li, M., Si, Y., *et al.* (2021). Panoramic transcriptome analysis and functional screening of long noncoding RNAs in mouse spermatogenesis. *Genome Res.* *31*, 13–26.
- Li, Y., Zheng, M., and Lau, Y.-F.C. (2014). The Sex-Determining Factors SRY and SOX9 Regulate Similar Target Genes and Promote Testis Cord Formation during Testicular Differentiation. *Cell Rep.* *8*, 723–733.
- Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., Zhong, G., Yu, B., Hu, W., Dai, L., *et al.* (2015). Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 256–264.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* *433*, 769–773.
- Lin, Y., and Page, D.C. (2005). Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. *Dev. Biol.* *288*, 309–316.
- Lin, Y., Gill, M.E., Koubova, J., and Page, D.C. (2008). Germ Cell-Intrinsic and -Extrinsic Factors Govern Meiotic Initiation in Mouse Embryos. *Science* *322*, 1685–1687.

- Lindeman, R.E., Gearhart, M.D., Minkina, A., Krentz, A.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2015). Sexual Cell-Fate Reprogramming in the Ovary by DMRT1. *Curr. Biol.* *25*, 764–771.
- Lipkin, S.M., Moens, P.B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J.W., Green, E.D., *et al.* (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat. Genet.* *31*, 385–390.
- Liu, C.-F., Parker, K., and Yao, H.H.-C. (2010). WNT4/ β -Catenin Pathway Maintains Female Germ Cell Survival by Inhibiting Activin β B in the Mouse Fetal Ovary. *PLoS ONE* *5*, e10382.
- Liu, D., Matzuk, M.M., Sung, W.K., Guo, Q., Wang, P., and Wolgemuth, D.J. (1998). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat. Genet.* *20*, 377–380.
- Liu, J., Nagy, Z., Joris, H., Tournaye, H., Devroey, P., and Van Steirteghem, A. (1995). Andrology: Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum. Reprod.* *10*, 626–629.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., *et al.* (2006). MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. *Mol. Cell* *21*, 187–200.
- Luangpraseuth-Prosper, A., Lesueur, E., Jouneau, L., Pailhoux, E., Cotinot, C., and Mandon-Pépin, B. (2015). TOPAZ1, a germ cell specific factor, is essential for male meiotic progression. *Dev. Biol.* *406*, 158–171.
- Lüders, J., and Stearns, T. (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 161–167.
- Luk, A.C.-S., Chan, W.-Y., Rennert, O.M., and Lee, T.-L. (2014). Long noncoding RNAs in spermatogenesis: insights from recent high-throughput transcriptome studies. *REPRODUCTION* *147*, R131–R141.
- Lukiw, W.J. (2013). Circular RNA (circRNA) in Alzheimer’s disease (AD). *Front. Genet.* *4*.
- Luo, Q., and Chen, Y. (2016). Long noncoding RNAs and Alzheimer’s disease. *Clin. Interv. Aging* *Volume 11*, 867–872.
- Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* *77*, 481–490.
- Lyon, M.F. (1962). Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* *14*, 135–148.
- Ma, L., Bajic, V.B., and Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol.* *10*, 924–933.
- Maatouk, D.M., Loveland, K.L., McManus, M.T., Moore, K., and Harfe, B.D. (2008). Dicer1 Is Required for Differentiation of the Mouse Male Germline. *Biol. Reprod.* *79*, 696–703.
- MacLean, G., Abu-Abed, S., Dollé, P., Tahayato, A., Chambon, P., and Petkovich, M. (2001). Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech. Dev.* *107*, 195–201.
- MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P., and Petkovich, M. (2007). Apoptotic Extinction of Germ Cells in Testes of Cyp26b1 Knockout Mice. *Endocrinology* *148*, 4560–4567.
- Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M.A., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M., and Burgoyne, P.S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* *27*, 271–276.

- Mahjoub, M.R., Xie, Z., and Stearns, T. (2010). Cep120 is asymmetrically localized to the daughter centriole and is essential for centriole assembly. *J. Cell Biol.* *191*, 331–346.
- Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Méjean, C., Berta, P., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J.* *24*, 1798–1809.
- Mallory, A.C., and Shkumatava, A. (2015). LncRNAs in vertebrates: advances and challenges. *Biochimie* *117*, 3–14.
- Manandhar, G., Schatten, H., and Sutovsky, P. (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol. Reprod.* *72*, 2–13.
- Mancini-DiNardo, D. (2006). Elongation of the *Kcnq1ot1* transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev.* *20*, 1268–1282.
- Mandel, H., Shemer, R., Borochoowitz, Z.U., Okopnik, M., Knopf, C., Indelman, M., Drugan, A., Tiosano, D., Gershoni-Baruch, R., Choder, M., *et al.* (2008). SERKAL Syndrome: An Autosomal-Recessive Disorder Caused by a Loss-of-Function Mutation in *WNT4*. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 39–47.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* *129*, 1261–1274.
- Mao, Y.S., Sunwoo, H., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011). Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* *13*, 95–101.
- Marahrens, Y., Panning, B., Dausman, J., Strauss, W., and Jaenisch, R. (1997). Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev.* *11*, 156–166.
- Marjanović, M., Sánchez-Huertas, C., Terré, B., Gómez, R., Scheel, J.F., Pacheco, S., Knobel, P.A., Martínez-Marchal, A., Aivio, S., Palenzuela, L., *et al.* (2015). CEP63 deficiency promotes p53-dependent microcephaly and reveals a role for the centrosome in meiotic recombination. *Nat. Commun.* *6*, 7676.
- Mark, M., Jacobs, H., Oulad-Abdelghani, M., Dennefeld, C., Feret, B., Vernet, N., Codreanu, C.-A., Chambon, P., and Ghyselinck, N.B. (2008). STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J. Cell Sci.* *121*, 3233–3242.
- Mark, M., Teletin, M., Vernet, N., and Ghyselinck, N.B. (2015). Role of retinoic acid receptor (RAR) signaling in post-natal male germ cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1849*, 84–93.
- Marks, H., Chow, J.C., Denissov, S., Francoijs, K.-J., Brockdorff, N., Heard, E., and Stunnenberg, H.G. (2009). High-resolution analysis of epigenetic changes associated with X inactivation. *Genome Res.* *19*, 1361–1373.
- Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 2808–2813.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* *476*, 101–104.
- McCoshen, J.A. (1983). Quantitation of sex chromosomal influence(s) on the somatic growth of fetal gonads in vivo. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *145*, 469–473.
- McElreavey, K., Vilain, E., Abbas, N., Herskowitz, I., and Fellous, M. (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3368–3372.

- McHugh, C.A., Chen, C.-K., Chow, A., Surka, C.F., Tran, C., McDonel, P., Pandya-Jones, A., Blanco, M., Burghard, C., Moradian, A., *et al.* (2015). The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* *521*, 232–236.
- Meistrich, M.L., and Hess, R.A. (2013). Assessment of Spermatogenesis Through Staging of Seminiferous Tubules. In *Spermatogenesis*, D.T. Carrell, and K.I. Aston, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 299–307.
- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M., *et al.* (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* *495*, 333–338.
- Mendis, S.H.S., Meachem, S.J., Sarraj, M.A., and Loveland, K.L. (2011). Activin A Balances Sertoli and Germ Cell Proliferation in the Fetal Mouse Testis. *Biol. Reprod.* *84*, 379–391.
- Mendoza-Lujambio, I., Burfeind, P., Dixkens, C., Meinhardt, A., Hoyer-Fender, S., Engel, W., and Neesen, J. (2002). The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1647–1658.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., *et al.* (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* *287*, 1489–1493.
- Merchant-Larios, H., and Moreno-Mendoza, N. (1998). Mesonephric Stromal Cells Differentiate into Leydig Cells in the Mouse Fetal Testis. *Exp. Cell Res.* *244*, 230–238.
- Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., and Buehr, M. (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int. J. Dev. Biol.* *37*, 407–415.
- Meunier, S., and Vernos, I. (2011). K-fibre minus ends are stabilized by a RanGTP-dependent mechanism essential for functional spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1406–1414.
- Meunier, S., and Vernos, I. (2016). Acentrosomal Microtubule Assembly in Mitosis: The Where, When, and How. *Trends Cell Biol.* *26*, 80–87.
- Meyer-Ficca, M.L., Lonchar, J., Credidio, C., Ihara, M., Li, Y., Wang, Z.-Q., and Meyer, R.G. (2009). Disruption of Poly(ADP-Ribose) Homeostasis Affects Spermiogenesis and Sperm Chromatin Integrity in Mice. *Biol. Reprod.* *81*, 46–55.
- Minajigi, A., Froberg, J.E., Wei, C., Sunwoo, H., Kesner, B., Colognori, D., Lessing, D., Payer, B., Boukhali, M., Haas, W., *et al.* (2015). A comprehensive Xist interactome reveals cohesin repulsion and an RNA-directed chromosome conformation. *Science* *349*, aab2276–aab2276.
- Miyabayashi, K., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Baba, T., Shima, Y., Sugiyama, N., Kitamura, K., and Morohashi, K. (2013). Aristaless related homeobox gene, *Arx*, is implicated in mouse fetal Leydig cell differentiation possibly through expressing in the progenitor cells. *PLoS One* *8*, e68050.
- Mochida, K., Tres, L.L., and Kierszenbaum, A.L. (1999). Structural and biochemical features of fractionated spermatid manchettes and sperm axonemes of the azh/azh mutant mouse. *Mol. Reprod. Dev.* *52*, 434–444.
- Moens, P.B., Kolas, N.K., Tarsounas, M., Marcon, E., Cohen, P.E., and Spyropoulos, B. (2002). The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J. Cell Sci.* *115*, 1611–1622.

- Moens, P.B., Marcon, E., Shore, J.S., Kochakpour, N., and Spyropoulos, B. (2007). Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* *120*, 1017–1027.
- Molyneaux, K., and Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 537–543.
- Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., and Wylie, C. (2001). Time-Lapse Analysis of Living Mouse Germ Cell Migration. *Dev. Biol.* *240*, 488–498.
- Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., *et al.* (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* *130*, 4279–4286.
- Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., Marzi, L., Cohen-Solal, A., Georg, I., Klattig, J., *et al.* (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* *136*, 1813–1821.
- Monnier, P., Martinet, C., Pontis, J., Stancheva, I., Ait-Si-Ali, S., and Dandolo, L. (2013). H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 20693–20698.
- Montazer-Torbati, F., Kocer, A., Auguste, A., Renault, L., Charpigny, G., Pailhoux, E., and Pannetier, M. (2010). A study of goat SRY protein expression suggests putative new roles for this gene in the developing testis of a species with long-lasting SRY expression. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *239*, 3324–3335.
- Morelli, M.A., and Cohen, P.E. (2005). Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reprod. Camb. Engl.* *130*, 761–781.
- Morimoto, A., Shibuya, H., Zhu, X., Kim, J., Ishiguro, K., Han, M., and Watanabe, Y. (2012). A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J. Cell Biol.* *198*, 165–172.
- Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr. Rev.* *25*, 747–806.
- Murphy, L., and O'Shaughnessy, P.J. (1991). Testicular steroidogenesis in the testicular feminized (Tfm) mouse: loss of 17 α -hydroxylase activity. *J. Endocrinol.* *131*, 443–449.
- Murphy, M.W., Lee, J.K., Rojo, S., Gearhart, M.D., Kurahashi, K., Banerjee, S., Loeuille, G.-A., Bashamboo, A., McElreavey, K., Zarkower, D., *et al.* (2015). An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 442–451.
- Nagano, T., Mitchell, J.A., Sanz, L.A., Pauler, F.M., Ferguson-Smith, A.C., Feil, R., and Fraser, P. (2008). The Air Noncoding RNA Epigenetically Silences Transcription by Targeting G9a to Chromatin. *Science* *322*, 1717–1720.
- Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y.F., Goshima, N., and Hirose, T. (2012). Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles: lncRNA processing for nuclear body architecture. *EMBO J.* *31*, 4020–4034.
- Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, G., and Hirose, T. (2011). Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J. Cell Biol.* *193*, 31–39.
- Nakagawa, T., Nabeshima, Y., and Yoshida, S. (2007). Functional Identification of the Actual and Potential Stem Cell Compartments in Mouse Spermatogenesis. *Dev. Cell* *12*, 195–206.

- Namekawa, S.H., Park, P.J., Zhang, L.-F., Shima, J.E., McCarrey, J.R., Griswold, M.D., and Lee, J.T. (2006). Postmeiotic Sex Chromatin in the Male Germline of Mice. *Curr. Biol.* *16*, 660–667.
- Naro, C., Jolly, A., Di Persio, S., Bielli, P., Setterblad, N., Alberdi, A.J., Vicini, E., Geremia, R., De la Grange, P., and Sette, C. (2017). An Orchestrated Intron Retention Program in Meiosis Controls Timely Usage of Transcripts during Germ Cell Differentiation. *Dev. Cell* *41*, 82–93.e4.
- Naughton, C.K., Jain, S., Strickland, A.M., Gupta, A., and Milbrandt, J. (2006). Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor-Mediated RET Signaling Regulates Spermatogonial Stem Cell Fate¹. *Biol. Reprod.* *74*, 314–321.
- Necsulea, A., Soumillon, M., Warnefors, M., Liechti, A., Daish, T., Zeller, U., Baker, J.C., Grützner, F., and Kaessmann, H. (2014). The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature* *505*, 635–640.
- Nel-Themaat, L., Vadakkan, T.J., Wang, Y., Dickinson, M.E., Akiyama, H., and Behringer, R.R. (2009). Morphometric analysis of testis cord formation in *Sox9-EGFP* mice. *Dev. Dyn.* *238*, 1100–1110.
- Nel-Themaat, L., Jang, C.-W., Stewart, M.D., Akiyama, H., Viger, R.S., and Behringer, R.R. (2011). Sertoli Cell Behaviors in Developing Testis Cords and Postnatal Seminiferous Tubules of the Mouse. *Biol. Reprod.* *84*, 342–350.
- Nicholls, P.K., Harrison, C.A., Rainczuk, K.E., Wayne Vogl, A., and Stanton, P.G. (2013). Retinoic acid promotes Sertoli cell differentiation and antagonises activin-induced proliferation. *Mol. Cell. Endocrinol.* *377*, 33–43.
- Nickerson, H.D., Joshi, A., and Wolgemuth, D.J. (2007). Cyclin A1-deficient mice lack histone H3 serine 10 phosphorylation and exhibit altered aurora B dynamics in late prophase of male meiosis. *Dev. Biol.* *306*, 725–735.
- Nishant, K.T., Ravishankar, H., and Rao, M.R.S. (2004). Characterization of a Mouse Recombination Hot Spot Locus Encoding a Novel Non-Protein-Coding RNA. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5620–5634.
- Nishino, K., Yamanouchi, K., Naito, K., and Tojo, H. (2001). Characterization of Mesonephric Cells That Migrate into the XY Gonad during Testis Differentiation. *Exp. Cell Res.* *267*, 225–232.
- Nixon, B., De Iuliis, G.N., Hart, H.M., Zhou, W., Mathe, A., Bernstein, I.R., Anderson, A.L., Stanger, S.J., Skerrett-Byrne, D.A., Jamaluddin, M.F.B., *et al.* (2019). Proteomic Profiling of Mouse Epididymosomes Reveals their Contributions to Post-testicular Sperm Maturation. *Mol. Cell. Proteomics* *18*, S91–S108.
- Noblanc, A., Kocer, A., and Drevet, J.R. (2012). Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires: Le rôle de l'épididyme. *Médecine/Sciences* *28*, 519–525.
- Oakes, C.C., La Salle, S., Smiraglia, D.J., Robaire, B., and Trasler, J.M. (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev. Biol.* *307*, 368–379.
- O'Bryan, M.K., Takada, S., Kennedy, C.L., Scott, G., Harada, S., Ray, M.K., Dai, Q., Wilhelm, D., de Kretser, D.M., Eddy, E.M., *et al.* (2008). *Sox8* is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Dev. Biol.* *316*, 359–370.
- O'Donnell, L., and O'Bryan, M.K. (2014). Microtubules and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *30*, 45–54.
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., and Stanton, P.G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* *1*, 14–35.

- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., *et al.* (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* *436*, 207–213.
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., and Saitou, M. (2009). A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. *Cell* *137*, 571–584.
- Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D., and Heard, E. (2004). Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation During Early Mouse Development. *Science* *303*, 644–649.
- Okamoto, I., Patrat, C., Thépot, D., Peynot, N., Fauque, P., Daniel, N., Diabangouaya, P., Wolf, J.-P., Renard, J.-P., Duranthon, V., *et al.* (2011). Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* *472*, 370–374.
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update* *12*, 417–435.
- Oliva, R., and Dixon, G.H. (1991). Vertebrate Protamine Genes and the Histone-to-Protamine Replacement Reaction. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 25–94.
- Oliver-Bonet, M., Turek, P.J., Sun, F., Ko, E., and Martin, R.H. (2005). Temporal progression of recombination in human males. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* *11*, 517–522.
- Oréal, E., Mazaud, S., Picard, J.-Y., Magre, S., and Carré-Eusèbe, D. (2002). Different patterns of anti-Müllerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *225*, 221–232.
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol. Cell* *30*, 460–471.
- Orth, J.M. (1982). Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* *203*, 485–492.
- Orth, J.M. (1984). The Role of Follicle-Stimulating Hormone in Controlling Sertoli Cell Proliferation in Testes of Fetal Rats*. *Endocrinology* *115*, 1248–1255.
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L., and Lamperti, A.A. (1988). Evidence From Sertoli Cell-Depleted Rats Indicates That Spermatid Number in Adults Depends on Numbers of Sertoli Cells Produced During Perinatal Development*. *Endocrinology* *122*, 787–794.
- O'Shaughnessy, P.J. (2014). Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *29*, 55–65.
- O'Shaughnessy, P.J., Johnston, H., Willerton, L., and Baker, P.J. (2002). Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J. Cell Sci.* *115*, 3491–3496.
- Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Serval, N., Taourit, S., Furet, J.-P., Fellous, M., Grosclaude, F., Cribiu, E.P., Cotinot, C., *et al.* (2001). A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat. Genet.* *29*, 453–458.
- Palmer, N., Talib, S.Z.A., Singh, P., Goh, C.M.F., Liu, K., Schimenti, J.C., and Kaldis, P. (2020). A novel function for CDK2 activity at meiotic crossover sites. *PLOS Biol.* *18*, e3000903.
- Pandey, R.R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., Nagano, T., Mancini-DiNardo, D., and Kanduri, C. (2008). Kcnq1ot1 Antisense Noncoding RNA Mediates Lineage-Specific Transcriptional Silencing through Chromatin-Level Regulation. *Mol. Cell* *32*, 232–246.

- Panigrahi, S.K., Manterola, M., and Wolgemuth, D.J. (2017). Meiotic failure in cyclin A1-deficient mouse spermatocytes triggers apoptosis through intrinsic and extrinsic signaling pathways and 14-3-3 proteins. *PLoS One* *12*, e0173926.
- Pannetier, M., and Pailhoux, E. (2010). *FOXL2*, le gardien de l'identité ovarienne. *Médecine/Sciences* *26*, 470–473.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., and Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat. Genet.* *38*, 1304–1309.
- Păunescu, T.G., Shum, W.W.C., Huynh, C., Lechner, L., Goetze, B., Brown, D., and Breton, S. (2014). High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* *20*, 929–937.
- Pekarsky, Y., Balatti, V., Palamarchuk, A., Rizzotto, L., Veneziano, D., Nigita, G., Rassenti, L.Z., Pass, H.I., Kipps, T.J., Liu, C., *et al.* (2016). Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 5071–5076.
- van Pelt, A.M., and de Rooij, D.G. (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology* *128*, 697–704.
- van Pelt, A.M.M., van Dissel-Emiliani, F.M.F., Gaemers, I.C., van der Burg, M.J.M., Tanke, H.J., and de Rooij, D.G. (1995). Characteristics of a Spermatogonia and Preleptotene Spermatocytes in the Vitamin A-Deficient Rat Testis1. *Biol. Reprod.* *53*, 570–578.
- Penny, G.D., Kay, G.F., Sheardown, S.A., Rastan, S., and Brockdorff, N. (1996). Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* *379*, 131–137.
- Pépin, G., Perron, M.P., and Provost, P. (2012). Regulation of human Dicer by the resident ER membrane protein CLIMP-63. *Nucleic Acids Res.* *40*, 11603–11617.
- Perry, R.B.-T., and Ulitsky, I. (2016). The functions of long noncoding RNAs in development and stem cells. *Development* *143*, 3882–3894.
- Peters, J.-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 644–656.
- Pierucci-Alves, F., Clark, A.M., and Russell, L.D. (2001). A Developmental Study of the Desert Hedgehog-Null Mouse Testis1. *Biol. Reprod.* *65*, 1392–1402.
- Piprek, R.P., Kloc, M., and Kubiak, J.Z. (2016). Early Development of the Gonads: Origin and Differentiation of the Somatic Cells of the Genital Ridges. In *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*, R.P. Piprek, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–22.
- Pitetti, J.-L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M.D., Aubry, F., Cederroth, C.R., Urner, F., Fumel, B., Crausaz, M., *et al.* (2013). An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors in Regulating Sertoli Cell Proliferation, Testis Size, and FSH Action in Mice. *Mol. Endocrinol.* *27*, 814–827.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (1998). Meiotic Prophase Arrest with Failure of Chromosome Synapsis in Mice Deficient for *Dmc1*, a Germline-Specific RecA Homolog. *Mol. Cell* *1*, 697–705.
- Plug, A.W., Peters, A.H., Keegan, K.S., Hoekstra, M.F., de Boer, P., and Ashley, T. (1998). Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J. Cell Sci.* *111* (Pt 4), 413–423.

- Poirier, F., Chan, C.T., Timmons, P.M., Robertson, E.J., Evans, M.J., and Rigby, P.W. (1991). The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo. *Dev. Camb. Engl.* *113*, 1105–1114.
- Pöllänen, P., and Cooper, T.G. (1994). Immunology of the testicular excurrent ducts. *J. Reprod. Immunol.* *26*, 167–216.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* *463*, 1101–1105.
- Poulat, F., Soullier, S., Gozé, C., Heitz, F., Calas, B., and Berta, P. (1994). Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene SRY. *Hum. Mutat.* *3*, 200–204.
- Powers, N.R., Parvanov, E.D., Baker, C.L., Walker, M., Petkov, P.M., and Paigen, K. (2016). The Meiotic Recombination Activator PRDM9 Trimethylates Both H3K36 and H3K4 at Recombination Hotspots In Vivo. *PLOS Genet.* *12*, e1006146.
- Raaijmakers, J.A., van Heesbeen, R.G.H.P., Meaders, J.L., Geers, E.F., Fernandez-Garcia, B., Medema, R.H., and Tanenbaum, M.E. (2012). Nuclear envelope-associated dynein drives prophase centrosome separation and enables Eg5-independent bipolar spindle formation. *EMBO J.* *31*, 4179–4190.
- Rahmoun, M., Lavery, R., Laurent-Chaballier, S., Bellora, N., Philip, G.K., Rossitto, M., Symon, A., Pailhoux, E., Cammas, F., Chung, J., *et al.* (2017). In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Res.* *45*, 7191–7211.
- Raverdeau, M., Gely-Pernot, A., Féret, B., Dennefeld, C., Benoit, G., Davidson, I., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N.B. (2012). Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16582–16587.
- Raymond, C.S., Shamu, C.E., Shen, M.M., Seifert, K.J., Hirsch, B., Hodgkin, J., and Zarkower, D. (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* *391*, 691–695.
- Raymond, C.S., Kettlewell, J.R., Hirsch, B., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (1999). Expression of Dmrt1 in the Genital Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development. *Dev. Biol.* *215*, 208–220.
- Raymond, C.S., Murphy, W., O’Sullivan, M.G., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2000). Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* *14*, 2587–2595.
- Razzaq, T.M., Bass, R., Vines, D.J., Werner, F., Whawell, S.A., and Ellis, V. (2003). Functional regulation of tissue plasminogen activator on the surface of vascular smooth muscle cells by the type-II transmembrane protein p63 (CKAP4). *J. Biol. Chem.* *278*, 42679–42685.
- Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.-M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., and Drevet, J.R. (2006). Lipid Remodeling of Murine Epididymosomes and Spermatozoa During Epididymal Maturation. *Biol. Reprod.* *74*, 1104–1113.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C.A., Hunt, P.A., Liebe, B., Scherthan, H., and Jessberger, R. (2004). Cohesin SMC1 β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat. Cell Biol.* *6*, 555–562.
- Rinn, J.L., Bondre, C., Gladstone, H.B., Brown, P.O., and Chang, H.Y. (2006). Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs. *PLoS Genet.* *2*, e119.

- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Bruggmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., *et al.* (2007). Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* *129*, 1311–1323.
- Rival, C., Theas, M.S., Suescun, M.O., Jacobo, P., Guazzone, V., van Rooijen, N., and Lustig, L. (2008). Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *J. Pathol.* *215*, 108–117.
- da Rocha, S.T., and Heard, E. (2017). Novel players in X inactivation: insights into Xist-mediated gene silencing and chromosome conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 197–204.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo. *J. Cell Biol.* *146*, 905–916.
- Romanienko, P.J., and Camerini-Otero, R.D. (2000). The Mouse Spo11 Gene Is Required for Meiotic Chromosome Synapsis. *Mol. Cell* *6*, 975–987.
- de Rooij, D.G., Okabe, M., and Nishimune, Y. (1999). Arrest of spermatogonial differentiation in *jsd/jsd*, *Sl17H/Sl17H*, and cryptorchid mice. *Biol. Reprod.* *61*, 842–847.
- Rossi, M.N., and Antonangeli, F. (2014). LncRNAs: New Players in Apoptosis Control. *Int. J. Cell Biol.* *2014*, 473857.
- Royo, H., Polikiewicz, G., Mahadevaiah, S.K., Prosser, H., Mitchell, M., Bradley, A., de Rooij, D.G., Burgoyne, P.S., and Turner, J.M.A. (2010). Evidence that Meiotic Sex Chromosome Inactivation Is Essential for Male Fertility. *Curr. Biol.* *20*, 2117–2123.
- Russell, L.D., Russell, J.A., MacGregor, G.R., and Meistrich, M.L. (1991). Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *Am. J. Anat.* *192*, 97–120.
- Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H., and Saga, Y. (2009). The RNA-Binding Protein NANOS2 Is Required to Maintain Murine Spermatogonial Stem Cells. *Science* *325*, 1394–1398.
- Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H., and Li, E. (2001). Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 1275–1286.
- Saez, F., Ouvrier, A., and Drevet, J.R. (2011). Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J. Androl.* *13*, 11–17.
- Saiki, S., Sasazawa, Y., Imamichi, Y., Kawajiri, S., Fujimaki, T., Tanida, I., Kobayashi, H., Sato, F., Sato, S., Ishikawa, K.-I., *et al.* (2011). Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* *7*, 176–187.
- Saito, K. (2006). Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev.* *20*, 2214–2222.
- Saitou, M., Barton, S.C., and Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* *418*, 293–300.
- Salmon, N.A., Handyside, A.H., and Joyce, I.M. (2005). Expression of Sox8, Sf1, Gata4, Wt1, Dax1, and Fog2 in the mouse ovarian follicle: Implications for the regulation of Amh expression. *Mol. Reprod. Dev.* *70*, 271–277.
- Salzman, J., Chen, R.E., Olsen, M.N., Wang, P.L., and Brown, P.O. (2013). Cell-Type Specific Features of Circular RNA Expression. *PLoS Genet.* *9*, e1003777.

- Sarma, K., Levasseur, P., Aristarkhov, A., and Lee, J.T. (2010). Locked nucleic acids (LNAs) reveal sequence requirements and kinetics of Xist RNA localization to the X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 22196–22201.
- Sarropoulos, I., Marin, R., Cardoso-Moreira, M., and Kaessmann, H. (2019). Developmental dynamics of lncRNAs across mammalian organs and species. *Nature* *571*, 510–514.
- Sasaki, Y.T.F., Ideue, T., Sano, M., Mituyama, T., and Hirose, T. (2009). MENε/β noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 2525–2530.
- Schepers, G., Wilson, M., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2003). SOX8 Is Expressed during Testis Differentiation in Mice and Synergizes with SF1 to Activate the *Amh* Promoter *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* *278*, 28101–28108.
- Schmahl, J., and Capel, B. (2003). Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev. Biol.* *258*, 264–276.
- Schmahl, J., Eicher, E.M., Washburn, L.L., and Capel, B. (2000). Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 65–73.
- Schmahl, J., Kim, Y., Colvin, J.S., Ornitz, D.M., and Capel, B. (2004). Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* *131*, 3627–3636.
- Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.-C., and Treier, M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* *131*, 933–942.
- Schramm, S., Fraune, J., Naumann, R., Hernandez-Hernandez, A., Höög, C., Cooke, H.J., Alsheimer, M., and Benavente, R. (2011). A Novel Mouse Synaptonemal Complex Protein Is Essential for Loading of Central Element Proteins, Recombination, and Fertility. *PLoS Genet.* *7*, e1002088.
- Schrans-Stassen, B.H.G.J., van de Kant, H.J.G., de Rooij, D.G., and van Pelt, A.M.M. (1999). Differential Expression of c-kit in Mouse Undifferentiated and Differentiating Type A Spermatogonia. *Endocrinology* *140*, 5894–5900.
- Schuh, M., and Ellenberg, J. (2007). Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell* *130*, 484–498.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D.M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in Mitotic and Meiotic Cells. *Cell* *88*, 265–275.
- Seidl, C.I.M., Stricker, S.H., and Barlow, D.P. (2006). The imprinted Air ncRNA is an atypical RNAPII transcript that evades splicing and escapes nuclear export. *EMBO J.* *25*, 3565–3575.
- Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* *453*, 930–934.
- Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2009). Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* *25*, 19–29.
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., and Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* *274*, 271–279.
- Shang, Y., Zhu, F., Wang, L., Ouyang, Y.-C., Dong, M.-Z., Liu, C., Zhao, H., Cui, X., Ma, D., Zhang, Z., *et al.* (2017). Essential role for SUN5 in anchoring sperm head to the tail. *ELife* *6*, e28199.
- Sharpe, R., McKinnell, C., Kivlin, C., and Fisher, J. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* *769–784*.

She, Z.-Y., Zhong, N., Yu, K.-W., Xiao, Y., Wei, Y.-L., Lin, Y., Li, Y.-L., and Lu, M.-H. (2020). Kinesin-5 Eg5 is essential for spindle assembly and chromosome alignment of mouse spermatocytes. *Cell Div.* *15*, 6.

Shen, Y., Yu, X., Zhu, L., Li, T., Yan, Z., and Guo, J. (2018). Transfer RNA-derived fragments and tRNA halves: biogenesis, biological functions and their roles in diseases. *J. Mol. Med.* *96*, 1167–1176.

Shima, Y. (2019). Development of fetal and adult Leydig cells. *Reprod. Med. Biol.* *18*, 323–330.

Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguchi, S., Arakawa, T., Otake, H., Baba, T., Matsuzaki, S., Shishido, Y., Akiyama, H., Tachibana, T., *et al.* (2013). Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes. *Mol. Endocrinol.* *27*, 63–73.

Shima, Y., Miyabayashi, K., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Doi, M., Okamura, H., and Suzuki, K. (2018). Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells. *Development* *145*, dev169136.

Shinagawa, T., Huynh, L.M., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Kwak, H.-G., Dohmae, N., Noguchi, J., and Ishii, S. (2015). Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development* *142*, 1287–1292.

Shukla, A., Kong, D., Sharma, M., Magidson, V., and Loncarek, J. (2015). Plk1 relieves centriole block to reduplication by promoting daughter centriole maturation. *Nat. Commun.* *6*, 8077.

Siller, S.S., Sharma, H., Li, S., Yang, J., Zhang, Y., Holtzman, M.J., Winuthayanon, W., Colognato, H., Holdener, B.C., Li, F.-Q., *et al.* (2017). Conditional knockout mice for the distal appendage protein CEP164 reveal its essential roles in airway multiciliated cell differentiation. *PLoS Genet.* *13*, e1007128.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* *346*, 240–244.

Skinner, M.K., Tung, P.S., and Fritz, I.B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J. Cell Biol.* *100*, 1941–1947.

Sleutels, F., Zwart, R., and Barlow, D.P. (2002). The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* *415*, 810–813.

Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., and Pardalidis, N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *109*, 323–330.

Soh, Y.Q.S., Mikedis, M.M., Kojima, M., Godfrey, A.K., de Rooij, D.G., and Page, D.C. (2017). Meioc maintains an extended meiotic prophase I in mice. *PLoS Genet.* *13*, e1006704.

Soumillon, M., Necsulea, A., Weier, M., Brawand, D., Zhang, X., Gu, H., Barthès, P., Kokkinaki, M., Nef, S., Gnirke, A., *et al.* (2013). Cellular Source and Mechanisms of High Transcriptome Complexity in the Mammalian Testis. *Cell Rep.* *3*, 2179–2190.

Souquet, B., Abby, E., Hervé, R., Finsterbusch, F., Tourpin, S., Le Bouffant, R., Duquenne, C., Messiaen, S., Martini, E., Bernardino-Sgherri, J., *et al.* (2013). MEIOB Targets Single-Strand DNA and Is Necessary for Meiotic Recombination. *PLoS Genet.* *9*, e1003784.

Staples, C.J., Myers, K.N., Beveridge, R.D.D., Patil, A.A., Lee, A.J.X., Swanton, C., Howell, M., Boulton, S.J., and Collis, S.J. (2012). The centriolar satellite protein Cep131 is important for genome stability. *J. Cell Sci.* *125*, 4770–4779.

- Stévant, I., Neirijnck, Y., Borel, C., Escoffier, J., Smith, L.B., Antonarakis, S.E., Dermitzakis, E.T., and Nef, S. (2018). Deciphering Cell Lineage Specification during Male Sex Determination with Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Rep.* 22, 1589–1599.
- Stévant, I., Kühne, F., Greenfield, A., Chaboissier, M.-C., Dermitzakis, E.T., and Nef, S. (2019). Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep.* 26, 3272-3283.e3.
- Strnad, P., Leidel, S., Vinogradova, T., Euteneuer, U., Khodjakov, A., and Gönczy, P. (2007). Regulated HsSAS-6 Levels Ensure Formation of a Single Procentriole per Centriole during the Centrosome Duplication Cycle. *Dev. Cell* 13, 203–213.
- Sullivan, R., and Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *REPRODUCTION* 146, R21–R35.
- Sun, S.-C., and Kim, N.-H. (2012). Spindle assembly checkpoint and its regulators in meiosis. *Hum. Reprod. Update* 18, 60–72.
- Sun, J., Lin, Y., and Wu, J. (2013a). Long Non-Coding RNA Expression Profiling of Mouse Testis during Postnatal Development. *PLoS ONE* 8, e75750.
- Sun, S., Del Rosario, B.C., Szanto, A., Ogawa, Y., Jeon, Y., and Lee, J.T. (2013b). Jpx RNA Activates Xist by Evicting CTCF. *Cell* 153, 1537–1551.
- Suzuki, A., and Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev.* 22, 430–435.
- Suzuki, H., and Tsukahara, T. (2014). A View of Pre-mRNA Splicing from RNase R Resistant RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 9331–9342.
- Suzuki, A., Tsuda, M., and Saga, Y. (2007). Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. *Dev. Camb. Engl.* 134, 77–83.
- Svingen, T., and Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27, 2409–2426.
- Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S.E., Hawkins, C.F., Wolgemuth, D.J., and Carrington, M. (1996). A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 122, 53–64.
- Taiana, E., Ronchetti, D., Todoerti, K., Nobili, L., Tassone, P., Amodio, N., and Neri, A. (2020). LncRNA NEAT1 in Paraspeckles: A Structural Scaffold for Cellular DNA Damage Response Systems? *Non-Coding RNA* 6, 26.
- Tam, P.P., and Snow, M.H. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64, 133–147.
- Tamashiro, D.A.A., Alarcón, V.B., and Marikawa, Y. (2008). Ectopic expression of mouse Sry interferes with Wnt/ β -catenin signaling in mouse embryonal carcinoma cell lines. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1780, 1395–1402.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Toyama, Y., Kitamura, K., Takahashi, T., Kaseda, K., Maekawa, M., and Nishimune, Y. (2004). Mice Deficient in the Axonemal Protein Tektin-t Exhibit Male Infertility and Immotile-Cilium Syndrome Due to Impaired Inner Arm Dynein Function. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7958–7964.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., *et al.* (2005). HANP1/H1T2, a Novel Histone H1-Like Protein Involved in Nuclear Formation and Sperm Fertility. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7107–7119.

- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., and Noce, T. (2000). The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* *14*, 841–853.
- Tanenbaum, M.E., Macûrek, L., Janssen, A., Geers, E.F., Alvarez-Fernández, M., and Medema, R.H. (2009). Kif15 Cooperates with Eg5 to Promote Bipolar Spindle Assembly. *Curr. Biol.* *19*, 1703–1711.
- Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R.E., and Moens, P.B. (1999). Rad51 and Dmc1 Form Mixed Complexes Associated with Mouse Meiotic Chromosome Cores and Synaptonemal Complexes. *J. Cell Biol.* *147*, 207–220.
- Taylor, D.H., Chu, E.T.-J., Spektor, R., and Soloway, P.D. (2015). Long non-coding RNA regulation of reproduction and development: IncRNA REGULATION OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT. *Mol. Reprod. Dev.* *82*, 932–956.
- Teclé, E., and Gagneux, P. (2015). Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx: FUNCTIONS OF THE MAMMALIAN SPERM GLYCOCALYX. *Mol. Reprod. Dev.* *82*, 635–650.
- Teletin, M., Vernet, N., Yu, J., Klopfenstein, M., Jones, J.W., Féret, B., Kane, M.A., Ghyselinck, N.B., and Mark, M. (2019). Two functionally redundant sources of retinoic acid secure spermatogonia differentiation in the seminiferous epithelium. *Dev. Camb. Engl.* *146*.
- Terranova, R., Yokobayashi, S., Stadler, M.B., Otte, A.P., van Lohuizen, M., Orkin, S.H., and Peters, A.H.F.M. (2008). Polycomb Group Proteins Ezh2 and Rnf2 Direct Genomic Contraction and Imprinted Repression in Early Mouse Embryos. *Dev. Cell* *15*, 668–679.
- Tevosian, S.G., Albrecht, K.H., Crispino, J.D., Fujiwara, Y., Eicher, E.M., and Orkin, S.H. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 4627–4634.
- They, M., Racine, V., Piel, M., Pepin, A., Dimitrov, A., Chen, Y., Sibarita, J.-B., and Bornens, M. (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 19771–19776.
- Tian, D., Sun, S., and Lee, J.T. (2010). The Long Noncoding RNA, Jpx, Is a Molecular Switch for X Chromosome Inactivation. *Cell* *143*, 390–403.
- Tikhonenko, I., Magidson, V., Gräf, R., Khodjakov, A., and Koonce, M.P. (2013). A kinesin-mediated mechanism that couples centrosomes to nuclei. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 1285–1296.
- Trovero, M.F., Rodríguez-Casuriaga, R., Romeo, C., Santiñaque, F.F., François, M., Folle, G.A., Benavente, R., Sotelo-Silveira, J.R., and Geisinger, A. (2020). Revealing stage-specific expression patterns of long noncoding RNAs along mouse spermatogenesis. *RNA Biol.* *17*, 350–365.
- Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2010). Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. *Science* *329*, 689–693.
- Tsuda, M. (2003). Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science* *301*, 1239–1241.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and Morita, T. (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 6236–6240.
- Tulu, U.S., Fagerstrom, C., Ferenz, N.P., and Wadsworth, P. (2006). Molecular Requirements for Kinetochore-Associated Microtubule Formation in Mammalian Cells. *Curr. Biol.* *16*, 536–541.

- Turner, T.T. (1995). On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J. Androl.* *16*, 292–298.
- Turner, J.M.A., Aprelikova, O., Xu, X., Wang, R., Kim, S., Chandramouli, G.V.R., Barrett, J.C., Burgoyne, P.S., and Deng, C.-X. (2004). BRCA1, Histone H2AX Phosphorylation, and Male Meiotic Sex Chromosome Inactivation. *Curr. Biol.* *14*, 2135–2142.
- Turner, J.M.A., Mahadevaiah, S.K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C.-X., and Burgoyne, P.S. (2005). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat. Genet.* *37*, 41–47.
- Turner, J.M.A., Mahadevaiah, S.K., Ellis, P.J.I., Mitchell, M.J., and Burgoyne, P.S. (2006). Pachytene Asynapsis Drives Meiotic Sex Chromosome Inactivation and Leads to Substantial Postmeiotic Repression in Spermatids. *Dev. Cell* *10*, 521–529.
- Uchida, S., and Dimmeler, S. (2015). Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* *116*, 737–750.
- Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J.E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco, A., Cao, A., Schlessinger, D., and Pilia, G. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1171–1181.
- Uehara, R., Nozawa, R., Tomioka, A., Petry, S., Vale, R.D., Obuse, C., and Goshima, G. (2009). The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 6998–7003.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.-C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., *et al.* (2009). Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* *139*, 1130–1142.
- Ulitsky, I., and Bartel, D.P. (2013). lincRNAs: Genomics, Evolution, and Mechanisms. *Cell* *154*, 26–46.
- Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C.H., Sive, H., and Bartel, D.P. (2011). Conserved Function of lincRNAs in Vertebrate Embryonic Development despite Rapid Sequence Evolution. *Cell* *147*, 1537–1550.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., and McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* *397*, 405–409.
- van Werven, F.J., Neuert, G., Hendrick, N., Lardenois, A., Buratowski, S., van Oudenaarden, A., Primig, M., and Amon, A. (2012). Transcription of Two Long Noncoding RNAs Mediates Mating-Type Control of Gametogenesis in Budding Yeast. *Cell* *150*, 1170–1181.
- Varmark, H., Llamazares, S., Rebollo, E., Lange, B., Reina, J., Schwarz, H., and Gonzalez, C. (2007). Asterless Is a Centriolar Protein Required for Centrosome Function and Embryo Development in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *17*, 1735–1745.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* *318*, 1931–1934.
- Vedrenne, C., and Hauri, H.-P. (2006). Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion. *Traffic Cph. Den.* *7*, 639–646.
- Veitia, R., Nunes, M., Brauner, R., Doco-Fenzy, M., Joanny-Flinois, O., Jaubert, F., Lortat-Jacob, S., Fellous, M., and McElreavey, K. (1997). Deletions of Distal 9p Associated with 46,XY Male to Female Sex Reversal: Definition of the Breakpoints at 9p23.3–p24.1. *Genomics* *41*, 271–274.

- Vergnaud, G., Page, D.C., Simmler, M.C., Brown, L., Rouyer, F., Noel, B., Botstein, D., de la Chapelle, A., and Weissenbach, J. (1986). A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* *38*, 109–124.
- Vernet, N., Mahadevaiah, S.K., de Rooij, D.G., Burgoyne, P.S., and Ellis, P.J.I. (2016). *Zfy* genes are required for efficient meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) in spermatocytes. *Hum. Mol. Genet.* *ddw344*.
- Vernet, N., Condrea, D., Mayere, C., Féret, B., Klopfenstein, M., Magnant, W., Alunni, V., Teletin, M., Souali-Crespo, S., Nef, S., *et al.* (2020). Meiosis occurs normally in the fetal ovary of mice lacking all retinoic acid receptors. *Sci. Adv.* *6*.
- Vidal, V.P.I., Chaboissier, M.-C., de Rooij, D.G., and Schedl, A. (2001). *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* *28*, 216–217.
- Vogl, A.W., Pfeiffer, D.C., Mulholland, D., Kimel, G., and Guttman, J. (2000). Unique and Multifunctional Adhesion Junctions in the Testis. *Ectoplasmic Specializations. Arch. Histol. Cytol.* *63*, 1–15.
- Vogl, A.W., Young, J.S., and Du, M. (2013). New Insights into Roles of Tubulobulbar Complexes in Sperm Release and Turnover of Blood-Testis Barrier. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 319–355.
- de Vries, F.A.T. (2005). Mouse *Sycp1* functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev.* *19*, 1376–1389.
- de Vries, F.A.T., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W.M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J.-G., van Zeeland, A.A., Heyting, C., and Pastink, A. (2005). Mouse *Sycp1* functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev.* *19*, 1376–1389.
- de Vries, S.S., Baart, E.B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D.G., de Boer, P., and te Riele, H. (1999). Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev.* *13*, 523–531.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantès, J., Bricarelli, F.D., Keutel, J., Hustert, E., *et al.* (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* *79*, 1111–1120.
- Wang, K.C., Yang, Y.W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B.R., Protacio, A., Flynn, R.A., Gupta, R.A., *et al.* (2011). A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* *472*, 120–124.
- Watanabe, S., and Goshima, G. (2014). Friction on MAP determines its traveling direction on microtubules. *Dev. Cell* *29*, 5–6.
- Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A., Hoki, Y., Fujiyama, A., Shibata, T., Sado, T., *et al.* (2011). MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev. Cell* *20*, 364–375.
- Wen, K., Yang, L., Xiong, T., Di, C., Ma, D., Wu, M., Xue, Z., Zhang, X., Long, L., Zhang, W., *et al.* (2016). Critical roles of long noncoding RNAs in *Drosophila* spermatogenesis. *Genome Res.* *26*, 1233–1244.
- Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J.A., Burton, M., and Sinclair, A.H. (2008). Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells. *Stem Cells* *26*, 339–347.
- White, J.A., Ramshaw, H., Taimi, M., Stangle, W., Zhang, A., Everingham, S., Creighton, S., Tam, S.-P., Jones, G., and Petkovich, M. (2000). Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 6403–6408.

- Whitfield, L.S., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1993). Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature* 364, 713–715.
- Wichman, L., Somasundaram, S., Breindel, C., Valerio, D.M., McCarrey, J.R., Hodges, C.A., and Khalil, A.M. (2017). Dynamic expression of long noncoding RNAs reveals their potential roles in spermatogenesis and fertility. *Biol. Reprod.* 97, 313–323.
- Wilde, A., Lizarraga, S.B., Zhang, L., Wiese, C., Gliksman, N.R., Walczak, C.E., and Zheng, Y. (2001). Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat. Cell Biol.* 3, 221–227.
- Willems, A., Batlouni, S.R., Esnal, A., Swinnen, J.V., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M., França, L.R., De Gendt, K., and Verhoeven, G. (2010). Selective Ablation of the Androgen Receptor in Mouse Sertoli Cells Affects Sertoli Cell Maturation, Barrier Formation and Cytoskeletal Development. *PLoS ONE* 5, e14168.
- Winters, T., McNicoll, F., and Jessberger, R. (2014). Meiotic cohesin STAG 3 is required for chromosome axis formation and sister chromatid cohesion. *EMBO J.* 33, 1256–1270.
- Wutz, A., Smrzka, O.W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E.F., and Barlow, D.P. (1997). Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 389, 745–749.
- Wutz, A., Theussl, H.C., Dausman, J., Jaenisch, R., Barlow, D.P., and Wagner, E.F. (2001). Non-imprinted *Igf2r* expression decreases growth and rescues the *Tme* mutation in mice. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1881–1887.
- Wutz, A., Rasmussen, T.P., and Jaenisch, R. (2002). Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of *Xist* RNA. *Nat. Genet.* 30, 167–174.
- Xu, H., Beasley, M.D., Warren, W.D., van der Horst, G.T.J., and McKay, M.J. (2005). Absence of Mouse REC8 Cohesin Promotes Synapsis of Sister Chromatids in Meiosis. *Dev. Cell* 8, 949–961.
- Xu, H., Yuan, S.-Q., Zheng, Z.-H., and Yan, W. (2013). The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Asian J. Androl.* 15, 799–805.
- Xu, X., Aprelikova, O., Moens, P., Deng, C.-X., and Furth, P.A. (2003). Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Dev. Camb. Engl.* 130, 2001–2012.
- Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohinata, Y., Seki, Y., and Saitou, M. (2006). Gene Expression Dynamics During Germline Specification in Mice Identified by Quantitative Single-Cell Gene Expression Profiling1. *Biol. Reprod.* 75, 705–716.
- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2008). Critical function of *Prdm14* for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* 40, 1016–1022.
- Yan, W., Ma, L., Burns, K.H., and Matzuk, M.M. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10546–10551.
- Yang, F., Fuente, R.D.L., Leu, N.A., Baumann, C., McLaughlin, K.J., and Wang, P.J. (2006). Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J. Cell Biol.* 173, 497–507.
- Yang, F., Gell, K., van der Heijden, G.W., Eckardt, S., Leu, N.A., Page, D.C., Benavente, R., Her, C., Hoog, C., McLaughlin, K.J., *et al.* (2008). Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev.* 22, 682–691.

- Yang, Y.W., Flynn, R.A., Chen, Y., Qu, K., Wan, B., Wang, K.C., Lei, M., and Chang, H.Y. (2014). Essential role of lncRNA binding for WDR5 maintenance of active chromatin and embryonic stem cell pluripotency. *ELife* 3, e02046.
- Yao, H.H.-C., Whoriskey, W., and Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 16, 1433–1440.
- Yao, H.H.C., Aardema, J., and Holthusen, K. (2006). Sexually Dimorphic Regulation of Inhibin Beta B in Establishing Gonadal Vasculature in Mice. *Biol. Reprod.* 74, 978–983.
- Yao, R.-W., Wang, Y., and Chen, L.-L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* 21, 542–551.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., and Morita, T. (1998). The Mouse RecA-like Gene *Dmc1* Is Required for Homologous Chromosome Synapsis during Meiosis. *Mol. Cell* 1, 707–718.
- Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T., and Nabeshima, Y.-I. (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev. Biol.* 269, 447–458.
- Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., and Nabeshima, Y. (2006). The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Dev. Camb. Engl.* 133, 1495–1505.
- Yu, Y.E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C.R., Deng, J.M., Russell, L.D., Weil, M.M., Behringer, R.R., and Meistrich, M.L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 4683–4688.
- Yuan, L., Liu, J.-G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., and Höög, C. (2000). The Murine SCP3 Gene Is Required for Synaptonemal Complex Assembly, Chromosome Synapsis, and Male Fertility. *Mol. Cell* 5, 73–83.
- Yuan, L., Liu, J.-G., Hoja, M.-R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., and Höög, C. (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 296, 1115–1118.
- Yuan, S., Zheng, H., Zheng, Z., and Yan, W. (2013). Proteomic Analyses Reveal a Role of Cytoplasmic Droplets as an Energy Source during Epididymal Sperm Maturation. *PLoS ONE* 8, e77466.
- Zeng, Y., Du, W.W., Wu, Y., Yang, Z., Awan, F.M., Li, X., Yang, W., Zhang, C., Yang, Q., Yee, A., *et al.* (2017). A Circular RNA Binds To and Activates AKT Phosphorylation and Nuclear Localization Reducing Apoptosis and Enhancing Cardiac Repair. *Theranostics* 7, 3842–3855.
- Zhang, C., Gao, L., and Xu, E.Y. (2016). LncRNA, a new component of expanding RNA-protein regulatory network important for animal sperm development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 59, 110–117.
- Zhang, F.-P., Poutanen, M., Wilbertz, J., and Huhtaniemi, I. (2001). Normal Prenatal but Arrested Postnatal Sexual Development of Luteinizing Hormone Receptor Knockout (LuRKO) Mice. *Mol. Endocrinol.* 15, 172–183.
- Zhang, H., Jiang, L., Sun, D., Hou, J., and Ji, Z. (2018). CircRNA: a novel type of biomarker for cancer. *Breast Cancer* 25, 1–7.

- Zhang, L., Lu, H., Xin, D., Cheng, H., and Zhou, R. (2010). A novel ncRNA gene from mouse chromosome 5 trans-splices with Dmrt1 on chromosome 19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *400*, 696–700.
- Zhang, X., Chen, Q., Feng, J., Hou, J., Yang, F., Liu, J., Jiang, Q., and Zhang, C. (2009). Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the TuRC to the centrosome. *J. Cell Sci.* *122*, 2240–2251.
- Zhao, L., Svingen, T., Ng, E.T., and Koopman, P. (2015). Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of Dmrt1. *Development* *142*, 1083–1088.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Yu, Y.E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J.M., Arango, N.A., Terry, N.H.A., Weil, M.M., *et al.* (2001). Targeted Disruption of the Transition Protein 2 Gene Affects Sperm Chromatin Structure and Reduces Fertility in Mice. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7243–7255.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Mounsey, S., and Meistrich, M.L. (2004). Nucleoprotein Transitions During Spermiogenesis in Mice with Transition Nuclear Protein Tnp1 and Tnp2 Mutations1. *Biol. Reprod.* *71*, 1016–1025.
- Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., and Han, D. (2014). Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.* *11*, 428–437.
- Zhou, Q., Li, Y., Nie, R., Friel, P., Mitchell, D., Evanoff, R.M., Pouchnik, D., Banasik, B., McCarrey, J.R., Small, C., *et al.* (2008). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol. Reprod.* *78*, 537–545.
- Zhu, Y., Lin, Y., He, Y., Wang, H., Chen, S., Li, Z., Song, N., and Sun, F. (2020). Deletion of lncRNA5512 has no effect on spermatogenesis and reproduction in mice. *Reprod. Fertil. Dev.* *32*, 706.
- Zirkin, B.R., and Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation†. *Biol. Reprod.* *99*, 101–111.

COMMUNICATIONS

Communication orale :

Chadourne M., Pomerol E., Mandon-Pépin, B. *“La fonction des ARNs non-codants longs au cours des divisions méiotiques de la spermatogenèse chez les mammifères : lien avec Topaz1”*.

3^{ème} Journées Reprosiences, 24 Avril 2019, Toulouse, France.

Chadourne, M. *“Topaz1 is a gene involved in male meiosis in mice”*. Au format "ma thèse en 180 secondes".

Colloque Des Jeunes Chercheurs, 28 mars 2019, Jouy-en-Josas, France

Chadourne M. *“Etude des gènes impliqués dans la prophase 1 méiotique mâle chez la souris, lien avec Topaz 1”*.

Journée des M2 de SAPS, 1^{er} Juin 2017, Jouy-en-Josas, France.

Posters :

Chadourne M., Pomerol E., Mandon-Pépin B. *“La fonction des ARNs non-codants longs au cours des divisions méiotiques de la spermatogenèse chez les mammifères : lien avec Topaz1”*.

3^{ème} Journées Reprosiences, 24-26 Avril 2019, Toulouse, France.

Chadourne M., Pomerol E., Mandon-Pépin B. *“Les ARNs non-codants longs au cours des divisions méiotiques de la spermatogenèse chez les mammifères : lien avec Topaz1”*.

Journée de l'école doctorale Biosigne. 19 Novembre 2019, Paris, France.

Chadourne M., Pomerol E., Mandon-Pépin, B. *“Long non-coding RNA function during meiotic divisions of spermatogenesis in mammals”*.

Inserm Workshop 251 on Non coding RNA: from detection to function. Septembre 2018, Bordeaux, France.

Titre : La suppression de *Topaz1* perturbe l'expression de lncARNs testiculaires au cours de la spermatogenèse murine.

Mots clés : *Topaz1*, Cellules germinales, Fuseau de microtubules, Méiose, Spermatogenèse, Souris

Résumé : *Topaz1* est un gène très conservé chez les vertébrés avec une expression spécifique des cellules germinales. Le modèle murin dépourvu de *Topaz1* a mis en évidence son rôle indispensable pour la fertilité mâle. L'absence de *Topaz1* entraîne un blocage des spermatocytes en fin de prophase I de méiose et un défaut d'alignement des chromosomes le long de la plaque métaphasique. De plus, à P20, les testicules *Topaz1*^{-/-} présentent 10% d'ARN non codants longs (lncARNs) dérégulés dans leur transcriptome.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont consisté (i) à poursuivre la caractérisation de l'arrêt méiotique chez les souris *Topaz1*^{-/-} et (ii) à étudier les lncARNs dérégulés en absence de *Topaz1*.

Les analyses RNAseq ont mis en évidence que des gènes associés au centrosome, à la dynamique des microtubules et à la spermatogenèse appartiennent aux voies moléculaires les plus perturbées dans les testicules *Topaz1*^{-/-}. De plus, un quart des transcrits dérégulés sont des lncARNs.

Trois d'entre eux, ont été étudiés par hybridation *in situ* et biologie moléculaire et sont spécifiques des cellules germinales. Puis, une lignée de souris exempt d'un de ces lncARNs a été générée grâce à la technologie CripsR/Cas9. Ces animaux sont fertiles dans les deux sexes mais les mâles présentent une diminution de plus de 50% de la concentration des spermatozoïdes épидидymaires ainsi qu'une modification des paramètres de motilité par rapport aux souris sauvages. Des analyses RNAseq ont montré que l'inactivation de ce lncARN perturbe l'expression de gènes codants impliqués dans la dynamique des microtubules, la spermatogenèse et la génération des gamètes haploïdes.

Topaz1 est indispensable pour la fertilité masculine chez la souris. Une mutation du gène *Topaz1* chez l'homme pourrait induire une azoospermie non obstructive. La régulation des lncARNs testiculaires représente un enjeu pour une bonne compréhension de la spermatogenèse.

Title : Suppression of *Topaz1* disrupts meiosis and expression of long non-coding RNAs in testis during murine spermatogenesis.

Keywords : *Topaz1*, germ cells, microtubule spindle, meiosis, spermatogenesis, mouse.

Abstract : *Topaz1*, a germ cell specific factor, is a highly conserved gene in vertebrates. *Topaz1*-inactivation mouse model demonstrated its essential role for male fertility. The absence of *Topaz1* arrested spermatocytes at the end of meiotic prophase I and showed chromosome misalignment along the metaphase I plate. Furthermore, at P20, transcriptome analysis showed that 10% of deregulated genes (DEGs) were long non-coding RNAs (lncRNAs).

The work during this PhD consisted (i) to pursue the study of meiotic arrest in *Topaz1*^{-/-} mouse and (ii) to study the lncRNA deregulated in absence of *Topaz1*. RNA-seq analyses show deregulated genes associated with centrosome, centriole, microtubule dynamics and spermatogenesis that belonged to the most disturbed molecular pathways in *Topaz1*^{-/-} testes. Moreover, a quarter of DEGs were lncRNAs.

Three of them, were studied by *in situ* hybridization and molecular biology techniques. They are male germ cell specific. Thus, a new mouse model deleted for one of these lncRNAs was generated using CRISPR/Cas9 technology. These mutant mice are fertile in both sexes. However, males present a decrease of more than 50% in epididymal sperm concentration as well as a change in motility parameters compared to wild-type mice. Other RNA-seq analyses show that this lncRNA disrupts expression of coding genes that regulate microtubule dynamics, spermatogenesis and haploid gamete generation.

The *Topaz1* gene is essential for fertility in male mice. A mutation of the *Topaz1* gene in men could also induce non-obstructive azoospermia. The regulation of testis-lncRNAs represents a challenge for a better understanding of spermatogenesis.