



HAL
open science

Voie de signalisation WNT/ β -catenin et différenciation des cellules germinales chez les mammifères

Morgane Le Rolle

► **To cite this version:**

Morgane Le Rolle. Voie de signalisation WNT/ β -catenin et différenciation des cellules germinales chez les mammifères. Biologie de la reproduction. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR6014 . tel-03505553

HAL Id: tel-03505553

<https://theses.hal.science/tel-03505553v1>

Submitted on 31 Dec 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.

THÈSE DE DOCTORAT

Voie de signalisation WNT/ β -catenin et
différenciation des cellules germinales
chez les mammifères

Morgane LE ROLLE

Institut de Biologie Valrose – Equipe Détermination du sexe et fertilité

Présentée en vue de l'obtention

du grade de docteur en Sciences de la Vie et de la
Santé

d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Mme. Anne-Amandine Chassot

Soutenue le : 29 novembre 2019

Devant le jury composé de :

Mr. Gabriel Livera, Rapporteur
Professeur, Université Paris-Saclay, Paris

Mr. Pierre Val, Rapporteur
Directeur de recherche, GReD, Clermont-Ferrand

Mme. Evelyn Houlston, Examinatrice
Directrice de Recherche, LBDV, Villefranche-sur-Mer

Mme. Maëlle Pannetier, Examinatrice
Chargée de recherche, INRA, Jouy-en-Josas

Mr. Thomas Lamonerie, Membre Invité
Professeur, iBV, Nice

Mme. Marie-Christine Chaboissier, Examinatrice
Directrice de recherche, iBV, Nice

Mme Anne-Amandine Chassot, Directrice de thèse,
Chargée de Recherche, iBV, Nice

VOIE DE SIGNALISATION WNT/B-CATENIN ET DIFFERENCIATION DES CELLULES GERMINALES CHEZ LES MAMMIFERES

Jury

Rapporteurs :

Mr. Gabriel Livera, Professeur, Université Paris-Saclay, Paris

Mr. Pierre Val, Directeur de recherche, GReD, Clermont-Ferrand

Examinatrices :

Mme. Evelyn Houliston, Directrice de Recherche, LBDV, Villefranche-sur-Mer

Mme. Maëlle Pannetier, Chargée de recherche, INRA, Jouy-en-Josas

Mme. Marie-Christine Chaboissier, Directrice de recherche, Institut Biologie Valrose, Nice

Membre Invité :

Mr. Thomas Lamonerie, Professeur, Institut Biologie Valrose, Nice

Directrice de thèse :

Mme. Anne-Amandine Chassot, Chargée de recherche, Institut Biologie Valrose, Nice

Directrice de l'équipe : Equipe Détermination du sexe et fertilité

Mme. Marie-Christine Chaboissier, Directrice d'équipe, Institut Biologie Valrose, Nice

Résumé

La préservation de la fertilité suscite une inquiétude croissante. Depuis les dernières décennies, la fertilité a diminué dans les pays industrialisés. En conséquence, un nombre croissant de couples a recours à la procréation médicalement assistée, sans grand succès par manque de connaissances sur les cellules reproductrices (cellules germinales). L'étude de ces cellules constitue un socle essentiel pour des applications médicales, mais jusqu'à présent, les mécanismes moléculaires qui régissent leur développement restent peu compris en raison de l'absence de modèles d'étude physiologiques.

Les cellules germinales sont produites au cours du développement embryonnaire, se multiplient pour constituer un stock suffisant, se différencient dans la gonade en fonction du sexe de l'embryon, puis entrent en méiose pour devenir des gamètes fertiles, les ovocytes (femelles) et les spermatozoïdes (mâles). Mon laboratoire d'accueil a démontré que la voie de signalisation canonique WNT/ β -catenin est nécessaire au développement de l'ovaire *in vivo* et qu'en absence d'activation de cette voie dans l'ovaire embryonnaire de souris, la prolifération et la différenciation des cellules germinales primordiales sont perturbées.

Tirant partie de notre expertise dans l'analyse de modèles de différenciation gonadique, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action de la voie WNT/ β -catenin dans la différenciation des cellules germinales, en analysant au moyen de modèles murins de perte et gain de fonction de β -catenin les conséquences de la modification de son expression dans les cellules de la gonade.

Dans un premier temps, nous avons démontré que le maintien, après la naissance, de l'activité de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules souches spermatogoniales du testicule de souris stimule leur prolifération de manière massive, provoquant un défaut de différenciation en spermatozoïdes. Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'ablation génétique du gène *Ctnnb1* (codant pour β -catenin) dans les cellules germinales primordiales *in vivo* entraîne une perte précoce de leur pluripotence et une différenciation prématurée en ovogonies. Nous avons démontré, pour la première fois *in vivo*, que tandis que le développement ovarien progresse, β -catenin forme des complexes protéiques avec POU5F1 et CDH1 qui transitent du noyau des cellules germinales à leur membrane, permettant ainsi leur sortie de pluripotence et leur différenciation. Nos résultats indiquent que l'E3-ubiquitine ligase ZNRF3 régule la pluripotence des cellules germinales par une boucle de rétroaction négative.

Ces données indiquent que dans l'ovaire comme dans le testicule, une régulation fine de l'activité de la voie de signalisation WNT/ β -catenin est requise pour déterminer la fenêtre de différenciation des cellules germinales primordiales *in vivo*. De plus, la voie WNT/ β -catenin contrôle la sortie de pluripotence des cellules germinales primordiales via une activité non-transcriptionnelle de β -catenin, permettant à terme de coordonner le développement des cellules somatiques et germinales de la gonade. Dans les années à venir, nos travaux pourraient aider à la génération des gamètes *in vitro*.

Mots clés : cellules germinales, pluripotence, différenciation, WNT/ β -catenin, POU5F1, ovaire

Summary

Since the last decennials, fertility is decreasing in industrial countries, and nowadays, infertility reaches a prevalence of 9 to 18% of the general population, with a significant proportion of cases being due to defective gametogenesis. Accordingly, fertility preservation raises a growing concern. Nowadays, a growing number of couples undergo Assisted Reproductive Technology with little success due to the lack of knowledge on mechanisms orchestrating germ cell differentiation. Little is known about how primordial germ cells become gametogenesis-competent cells (gonocytes), because of the lack of suitable physiological models. Primordial germ cells give rise to the next generation by differentiating from pluripotent progenitors into highly specialized cells, the gametes, which in turn generate a totipotent zygote after fertilization. After specification in the early embryo, primordial germ cells colonize the gonad, lose pluripotency and gain their capacity for irreversible sexual differentiation. Gonocytes then become either female (oogonia) or male (spermatogonia), and eventually progress into meiotic divisions. So far, the mechanisms of germ cell changes in potency remain largely elusive. My host laboratory has demonstrated that activation of the canonical WNT/ β -catenin signalling is required for ovarian development. Thus, absence of WNT/ β -catenin activation eventually triggers defects in germ cell proliferation and sexual differentiation. However, genetic models of cell-specific ablation of *Ctnnb1* (encoding β -catenin) were still missing to assess the contribution of WNT/ β -catenin in the germ cells.

We decided to analyse the role of this signalling pathway by generating specific mouse models for β -catenin loss or gain of function and by investigating the consequences of WNT/ β -catenin deregulation in either the somatic or the germ cells of the developing gonad.

We first demonstrated that WNT/ β -catenin regulates spermatogonial stem cell proliferation and differentiation in the post-natal testis, demonstrating that this signalling activity must be finely tuned over time to ensure spermatogenesis. Secondly, we showed that genetic elimination of *Ctnnb1* in mouse primordial germ cells *in vivo* leads to a precocious loss of pluripotency and to premature germ cell differentiation into gonocytes. We demonstrated, for the first time *in vivo*, that while ovarian development is getting forward, β -catenin forms proteic complexes containing POU5F1 and CDH1 that transit from the nucleus of the germ cells to their membrane, thus allowing primordial germ cells to exit pluripotency and eventually differentiate. Our results also reveal that the ZNRF3 E3-ubiquitine ligase negatively regulates germ cell exit from pluripotency through a negative feedback loop.

Collectively, our results show that the WNT/ β -catenin signalling is necessary for determining the proper window of differentiation in both somatic and germ cells. Moreover, WNT/ β -catenin controls the germ cell exit from pluripotency through β -catenin non-transcriptional activity, eventually coordinating the development of the different cell types of the fetal ovary. In the future, our results might help to recapitulate gametogenesis *in vitro*.

Key words: germ cells, pluripotency, differentiation, WNT/ β -catenin, POU5F1, ovary

A ma maman,

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie donc chaleureusement Pr. Gabriel Livera et Dr. Pierre Val d'avoir accepté d'étudier mon manuscrit et d'en être les rapporteurs ainsi que Dr. Evelyn Houlston et Dr. Maëlle Pannetier d'en être les examinatrices. Et enfin, un remerciement spécial au Pr. Thomas Lamonerie, membre invité de mon jury.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe du Dr. Marie-Christine Chaboissier, que je tiens tout particulièrement à remercier pour m'avoir accueillie au sein de son équipe en Master 1 puis le long de mes quatre années de thèse. Merci de m'avoir fait confiance !

Je remercie tous les membres de mon équipe : Aitaina, Elodie, Furong, Isabelle, Marie-Cécile et Nainoa, tous et toutes présents pendant ces quatre années pour leur soutien, conseils scientifiques et leurs rires. Je lance également un petit clin d'œil spécial à Elodie. Merci pour ton aide, nos (longues) conversations (plus intéressantes que de faire des PCRs), nos fous rires et tes petites chansons sifflées. Tu es une très belle rencontre ! Un autre petit clin d'œil à Marie-Cécile, autre belle rencontre et belle personne qui m'a prodigué de très bons conseils. Isa, merci tu as été le petit coup pouce secret qui m'a motivée pour la thèse, tu es un rayon de soleil !

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe de Dr. Andreas Schedl, les anciens et actuels, Amélie, Chamara, Fariba, Filippo, Marijus, Rodanthi, Vladimir et Yoannis pour ces bons moments passés à vos côtés et vos conseils scientifiques. Cher Filippo, O' roi du western blot, du clonage, et du confocal, je crois que je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout le temps et tous les conseils précieux que tu as pu m'offrir. Ton soutien fut précieux durant ces quatre années dans les mauvais et bons moments. Je serai bien triste de ne plus te voir à la machine à café le matin et pour la petite bière du vendredi soir (surtout quand tu envoies le message à 16h30 « beer-etta » et qu'on te dit « NON Fil il est trop tôt !! », la bière ce n'est pas à 16h30 mais plus tard vers 18h00-18h30*).

*Amandine va aussi lire les remerciements, alors il faut bien que je dise que c'est de ta faute.

Les girls, Serena et Chaïma, sans vous je crois bien que je n'aurais jamais aussi bien vécu cette dernière année. Serena, le calme qui camoufle un grain de folie, je suis ravie de t'avoir découverte, tu es vraiment une personne formidable. Merci de ton amitié, tu es une amie précieuse. Chaïma, bagrita, tu un rayon de soleil, merci d'avoir partagé avec moi ta bonne humeur au quotidien. Tu verras tout se passera bien, no stress même si déjà you want to die, au pire casse ta self au microscopeHome.

Je remercie également toutes les personnes de l'institut avec qui j'ai partagé mon quotidien, amis ou collègues, s'il est si facile de se motiver pour aller travailler c'est grâce à cet environnement de travail extraordinaire. Tizi, Céline, Torsten, Antho, Pierre, Nadia, Sarah, Cloclo, Charly, Aurélie x2, Kévin, Antoine, Angélo, Lolo, Raph, Agnès, Nat, Marie Alix et tellement d'autres...

Le meilleur pour la fin... Amandine, ma directrice de thèse. Je n'aurais jamais assez de mots pour te dire à quel point je te remercie. Je suis arrivée en master avec la ferme intention de ne pas faire de thèse. Venant d'un cursus professionnel, j'étais sûre de vouloir faire un master Pro afin de travailler au sein d'une plateforme animalerie. Et ainsi, lors d'un cours de « Biologie du développement » je t'ai rencontrée. J'ai tout de suite su je voulais faire mon stage avec toi. C'est au cours de ce dernier que tu m'as transmis ta passion pour la recherche et que j'ai eu envie de faire une thèse. Et heureusement que tu étais là, car sans toi et ta détermination je n'aurais jamais pu obtenir le financement de thèse de la Ligue. Merci de ta confiance. Au cours de ces quatre années, tu m'as tellement apporté, tu es une encadrante extraordinaire. Tu as su me transmettre une petite partie de ton savoir (j'ai encore beaucoup à apprendre), de ta passion pour la recherche et de ta rigueur expérimentale. Tu es un exemple pour moi.

Je tiens également à te remercier pour ta patience (« Amandine tu as 2 min ? », « Amandine j'ai oublié de te dire.. » « Amandine ? » « Amandine j'ai fait une bêtise »), ta compréhension, nos discussions très enrichissantes et surtout pour tes petits coups de pression bien placés. Tu as toujours su me motiver en me forçant à donner le meilleur de moi-même.

J'ai été ravie de travailler avec toi, tu es la meilleure encadrante que j'aie pu avoir. Je pense sincèrement que tu as un vrai talent pour transmettre tes passions. Merci pour tout !!!!

Je tiens maintenant à remercier des personnes qui me sont chères, car pour moi, il est très important d'avoir cet équilibre professionnel et personnel. Sans eux, je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout de mes projets. Merci à mes parents, sans vous et sans votre soutien je n'aurais jamais pu aller si loin dans les études. Surtout toi maman, tu as toujours été là surtout quand je n'y croyais plus, tu as toujours su m'écouter et me donner du courage. Surtout que je crois bien que cette thèse est le premier rapport que tu ne relis pas. Merci papa pour tous tes conseils. Coco mon petit frère, merci ! J'espère vous rendre fiers. Cookie, Juno, Vulcain et le petit dernier Lemmy un soutien psychologique hors pair !

Merci Lila, Justine et Ruxanda votre soutien me fait chaud au cœur.

Merci Mathilde ma plus vieille amie. Toujours là quand j'ai besoin.

Natasa et Oriane, une simple phrase vaut mieux de long discours vous savez déjà tout ! Une saison se termine, une nouvelle commence ! Vous êtes mes âmes sœurs.

Alex, la meilleur rencontre de ma vie, je n'ai qu'un mot à dire Da garan!

Tables des abréviations

Numérique

3 β -HSD : 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase

5mc : 5-methyl Cytosine

A

α -sma : α -Smooth Muscle Actin

A-P : Antéro-Postérieur

Aal : Spermatogonie A aligned

ACVR1 : Activin A receptor type 1 AIK2

ADN : Acid desoxy-ribonucléique

AID : Cytosine deaminaase

ALDH1A1/A2/A3 : Aldehyde déshydrogénases A1/A2/A3

ALK2 : Activin A receptor type 1

ALP : Phosphatase alcaline

AMH : Anti Müllerian Hormone

APC : Adenomatous Poluposis Coli

Apr : Spermatogonie A paired

ARN : Acide ribo-nucléique

As : Spermatogoniales A single

ASC : Cellules souches adultes

AR : Acide Rétinoïque

ATRA : All-*Trans* Retinoic Acid

AXIN : Axis Inhibition Protein

B

B6 : Lignée murine C57BL/6J

BAX : Bcl-2-associated X

BCL2 : B-cell lymphoma/leukemia 2

BLIMP1 : B-lymphocyte induced maturation protein 1

BMP : Bone Morphogenetic protein

BrDU : 5-bromo-2 désoxy-uridine

BRG1 : Swi/Snf-related, Matrix-associated, Actin-dependent Regulator of Chromatin, a, member 4; SMARCA4

C

Calmoduline : Calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase

CAMK2 : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2

CBX2 : Chromobox 2

CDC6 : Cell division cycle 6

CDH1 : E-cadherin

CDK : Cyclin dependent kinase

CDK2 : Cyclin dependent kinase 2

CDR : Domaine riche en cystéines

CDX1,2 : Caudal type homeo box transcription factor 1, 2

CHIR : Chiron CHIR99021

CIP/KIP : CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein

CRAB ; Cellular RA-binding poteine

CRBP : Cellular retinol binding protein

CSS : Cellules souches spermatogoniales

CTNNB1 : Catenin (cadherin-associated protein), beta 1 = β -catenin

CXCR4 : Chemokine (CXC motif) receptor 4

CXCR7b : Chemokine receptor 7b

CYP11A1 : Cytochrome P450 Subfamily XIA Polypeptide 1

CYP17A1 : Cytochrome P450 Subfamily XVIIIA
Polypeptide 1

CYP19A1 : Aromatase

CYP26A1 : Cytochrome P450 Subfamily
XXVIA Polypeptide 1

CYP26B1 : Cytochrome P450 Subfamily XXVIB
Polypeptide 1

CYP26C1 : Cytochrome P450 Subfamily XXVIC
Polypeptide 1

D

DAX1 : Dosage sensitive sex reversal adrenal
hypoplasia congenita critical region on the X

DAZL : Delated in azoospermia like

DDX4 : DEAD-Box Helicase 4

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHH : Desert Hedgehog

DKK : Dickkopf WNT Signaling Pathway
Inhibitor

DMC1 : Dosage suppressor of MCK1 homolog

DMRT1 : Doublesex and mab-3-related
transcription factors

DND : Dead-end-1

DNMT3L : DNA-methyltransferase 3L

DPPA3 : Developmental Pluripotency-
Associated Protein 3

DSD : Troubles du développement sexuel
(Disorder/Differences of Sexual Development)

DVL : Disheveled

E

E2 : 17- β -estradiol

eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein

EHMT1 : Euchromatic Histone Lysine
Methyltransferase 1

EMX2 : Empty Spiracles Homeobox 2

EpicScs : Epithelial cell Stem cells like

ERBB3 : Tyrosine Kinase Type Cell Surface
Receptor HER3

ERR β : Estrogen related receptor β

ESC : Cellules souches embryonnaires

ESR1 : Estrogen receptor 1 α = NR3A1

eYFP : enhanced Yellow Fluorescent Protein

F

FACS : Fluorescent activated cell sorting

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2

FGF9 : Fibroblast Growth Factor 9

FGFR2 : Fibroblast Growth Factor receptor 2

FIGL α : Factor In the GermLine /

Folliculogenesis Specific Basic Helix-Loop-
Helix

FMI : Flamingo

FOG2 : Friend of GATA

FOXD3 : Forkhead Box D3

FOXL2 : Forkhead box L2

FSH : Follicle Stimulating Hormone

FST : Follistatine

FUT4 : Fucosyltransferase 4

FZ : Frizzled

G

γ H2AX : γ H2A Histone Family Member X	GDNF : Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
GATA4 : GATE binding protein 4	GLI1 : GLI family zing finger 1
GCC : Cellules compétentes pour la gamétogenèse ou gonocytes	GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
GCD : Germ cell deficient	GPCR : Récepteur couples à la protéines G
GCNA1 : Germ cell nuclear antigen 1	GRG/TLE : Groucho-Related Protein
GDF9 : Growth differentiation factor 9	GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

H

H3K9me2 : Diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3	HMG : High Mobility Group
H3K27me3 : Triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3	HOXA1 : Homeobox A1
HIF2 α : Hypoxia-inducible factor 2a	HOXB1 : Homeobox B1
	HSPG : Heparan sulfate proteoglycans

I

iCRT3 : inhibition Catenin Responsive Transcription 3	IL2 : Interleukin 2
IFITM3 : Interferon-induced transmembrane protein 3	INSL3 : Insuline Like 3
IGFLR1 : Insulin Like Growth Factor 1 Receptor	iPS : Induced pluripotent stem cell
IHH : Indian Hedgehog	IR : Insulin Receptor
	IRR : Insulin Receptor-related Receptor

J

JNK : Junk-kinase	<i>Jpc</i> : Jours <i>post coïtum</i>
-------------------	---------------------------------------

K

Kit : cKit Receptor Tyrosine Kinase	KitL : Steel Ligand Kit
-------------------------------------	-------------------------

L

LEF : Lumphoid cell factor	LH : Luteinizing Hormone
LGR 4/5/6 : Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 4/5/6	LHCGR : Lutropin-Choriogonadotropic Hormone Receptor
LIF : Leukemia inhibitor factor	LHX9 : Lim Homeobox Protein 9
LIN28 : Lin-28 homolog	LRP5/6 : LDL receptor-related proteins 5/6

M

MaSC : Cellules souche Mammaires	MIS : Meiosis-Inducing Substance
MCI : Masse cellulaire interne du blastocyte	MMD2 : Monocyte to Macrophage Differentiation associated protein 2
MCM : Minichromosome maintenance complex	MPS : Meiosis-Preventing Substance
miARN : microARN	MSC1 : Mouse Sertoli cell line
miARN let-7 : let-7 microARN	MSX : Muscle segment homeobox
MIL-1 : Interferon-induced protein like gene-1	MVH : DEAD-Box Helicase 4

N

NANOG : Nanog Homeobox	NOBOX : Newborn oogenesis homeobox
NANOS : Nanos homolog	NOTCH : Notch homolog
NFAT : Nuclear factor of activated T-cells	NR5A1 : Nuclear Receptor Subfamily 5 groupe A Member 1

O

OCT3/4 : Octamer-binding transcription factor 4 = POU Class 5 Homeobox	OGCT : Tumeur des cellules germinales ovariennes
	ORF : Open reading frame

P

PA : Protéase en N-terminales	PIK3 : Phosphatidylinositol 3-kinase
PCP : Planar Cell Polarity	PK : Prickle espinas testin
PCR : Ploymerase chain reaction	PkA : Protéine kinase A
PDG2 : Prostaglandine D2	PKC : Proteine Kinase C
PDGF : Platelet Derived Growth Factor	PLC : Phospholipase C
PGC : Cellules germinales primordiales	PMA : Procréation Médicalement Assistée
PGC7 : Germ cell primitive 7	POG : Proliferation of germ cells

Pol II : ARN Polymérase II
PORC : Porcupine
POU5F1: POU Class 5 Homeobox
PRDM1 : PR domaine-containing 1, with ZNF
= BLIMP1

PRDM14 : PR domain-containing 14
PTCH1 : Patched1
PTGDR : Prostaglandin D2 receptor
PYGO : Pygopus

R

RAL : Rétinaldéhyde
RAR : Retinoic Acid Receptor
RARE : Elément de réponse à l'acide
rétinoïque
RB1 : Retinoblastoma 1
RDH : Rétinol déshydrogénases microsomales
RIF1 : Replication Timing Regulatory Factor 1

RNF43 : RING finger 43
ROR2 : Receptor Tyrosine Kinase Like
Orphan Receptor 2
RSPO1 : Roof Plate-Specific Spondin 1
RXREs : Retinoid X reponse element
RYK : Récepteur tyrosine kinase

S

SCF : Stem cell Factor
SDF-1 : Stromal derived factor 1
SEC14L2 : SEC14 Like Lipid Binding 2
SF1 : Steroidogenic Factor 1
sFRP : Protéines apparentées à Frizzled
sécrétées
SMAD1: Mothers against decapentaplegic
homolog family member 1
SMAD5: Mothers against decapentaplegic
homolog family member 5
SMARCA1 : ATP-dependent chromatin
remodeler
SOX2 : SRY Box2

SOX8 : SRY Box8
SOX9 : SRY Box-9
SOX17 : SRY Box 17
SRC : Non-receptor tyrosine kinase
SRY : Sex determining region of the Y
SSEA-1 : Specific embryonic antigen 1 =
Fucosyltransferase 4
STBM : Strabismus
STELLA : Developmental Pluripotency-
Associated Protein 3
STRA8 : Stimulated par retinoic acid 8
SVF : Sérum de veau fœtal
SYCP3 : Synaptonemal complex protein 3

T

TCF : T-cell factor

TDF : Testis Determining Factor

TER : Teratoma

TESCO : Testis-specific Enhancer of Sox9
Core Element

TGCT : Tumeur des cellules germinales
testiculaires

TGF β : Transforming Growth Factor β

TFAP2C : Activating protein 2 gamma = AP2 γ

TNAP : Tissue non-specific alkaline
phosphatase

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

TSR : Thrombospondine

TZP : Processus transzonaux (filopode)

U

UBR5 : Ubiquitin-protein ligase

V

VASA : DEAD-Box Helicase 4

VCP/p97 : Valosin Containing Protein /p97

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

W

WIF1 : Wnt Inhibitor Factor 1

WLS : WntLess

WNT4 : Wingless-Type MMTV Integration
Site Family member 4

WT1 : Wilms Tumour gene

X

XIC : X inactivation center

XIST : X inactive specific transcript

Y

YAP/TAZ : Yes-associated protein

Z

ZNRF3 : Zinc RING finger 3

ZFY : Zinc Finger Protein Y-Linked

Lexique

A

Adénocarcinome : tumeur maligne d'origine glandulaire.

Adénocarcinome canalaire pancréatique : Cancer du pancréas qui touche les cellules qui produisent le suc pancréatique, nécessaire à la digestion des aliments.

Adénocarcinome gastrique : Cancer de l'estomac.

Atrésie : Processus par lequel les follicules ovariens immatures dégénèrent. Les cellules arrêtent de proliférer et rentrent en apoptose.

B

Blépharophimose-ptose-épicanthus : Malformation de la paupière

C

Canaux de Müller / Canaux de Wolff : Les canaux de Müller, avec les canaux de Wolff, constituent les futures voies génitales des mammifères. Au cours de l'embryogenèse, lors du stade indifférencié les deux types de canaux se forment, l'un ou l'autre régressera en fonction de la détermination du sexe. Chez le mâle, les cellules de Sertoli sécrètent l'AMH qui va entraîner la dégénération des canaux de Müller. Les cellules de Leydig sécrètent la Testostérone qui entraînera la différenciation des canaux de Wolff pour former le tractus génital mâle (épididyme, prostate, vas deferens) Chez la femelle, les canaux de Müller donneront naissance à l'oviducte, l'utérus et le vagin.

Caractères primaires : Caractères sexuels primaires résultant de la différenciation des testicules chez le mâle et des ovaires chez la femelle, aboutissant à la formation des organes génitaux externes.

Carcinome embryonnaire : Tumeur maligne se développant à partir de cellules germinales (spermatozoïdes chez l'homme et ovules chez la femme) qui vont se différencier en cellules ressemblant aux tissus d'un embryon précoce.

Carcinome épidermoïde : Cancer se développant à partir de cellules squameuses (kératinocytes) de la peau, touchent la peau et les muqueuses.

Carcinome in situ : Cancer, souvent précoce, dont les cellules tumorales n'ont pas encore envahi les tissus voisins et restent dans le lieu où elles ont leur origine.

Cellules souches : cellules capables de se multiplier à l'infini en conservant le patrimoine génétique. Elles sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires.

Clairance : Capacité d'un tissu, organe ou organisme de débarrasser un liquide biologique (le sang, la lymphe, etc.) d'une substance donnée.

Chimère XX XY : Une chimère est un organisme formé de deux (ou plus) populations de cellules génétiquement distinctes. Dans le cas des souris chimériques XX XY, ce sont des souris qui ont été produites en injectant des cellules ES mâles ou femelles dans des blastocystes hôtes non sexés. Les méthodes utilisées pour l'évaluation de la fertilité des chimères sont décrites par (Ansell et al. 1991).

Chip-PET : Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing. Technique qui intègre l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et le Couplé-End Balises qui est le séquençage à haut débit pour déterminer, de novo, des interactions de la chromatine à longue distance à l'échelle du génome.

Cholangiocarcinome : Tumeur du foie qui se développe à partir de l'épithélium tapissant les voies biliaires.

Choriocarcinome : Tumeur maligne du trophoblaste, généralement du placenta. Classée également comme une tumeur des cellules germinales, elle peut se développer dans les ovaires ou les testicules.

Axe hypothalamo-hypophysaire : Ensemble fonctionnel composé de l'hypothalamus et de l'hypophyse. L'hypothalamus et l'hypophyse sont deux glandes endocrines situées à la base du cerveau. Elles jouent un rôle fondamental au niveau hormonal.

Cordons testiculaires : Ebauches des tubes séminifères. Ils contiennent les cellules germinales, les cellules de Sertoli et sont entourés d'une lame basale et des cellules myoïdes. Au cours de l'embryogenèse, ils vont se différencier en tubes séminifères contournés (lieu de la spermatogenèse), reliés au *rete testis* par les tubes séminifères droits. Le *rete testis* est le point de connexion avec l'épididyme et le canal de Wolff.

Cytokine : Substance soluble de signalisation cellulaire synthétisée par les cellules du système immunitaire ou d'autres tissus. Les cytokines agissent à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction.

D

Dysgénésie gonadique : Défaut de formation des gonades, chez des patients XX et XY

Dysménorrhée : Absence de règles

Dysplasie campomélique : Maladie très rare, caractérisée par l'association variable d'anomalies squelettiques (incurvation et gracilité des os longs, anomalies du bassin et du thorax, présence de 11 paires de côtes) à des anomalies extra squelettiques (dysmorphie faciale, fente palatine, ambiguïté ou inversion sexuelle chez 2/3 des garçons, malformations cérébrales, cardiaques et rénales).

E

Ectoderme : Feuillet externe de l'embryon qui se met en place au moment de la gastrulation.

Empreinte Parentale (Paternelle ou maternelle) : Chez les organismes diploïdes, un gène est soumis à l'empreinte parentale lorsque la copie héritée de la mère et la copie du père ne sont pas exprimées de la même manière. Généralement, l'une des deux copies est éteinte pour laisser l'autre active.

Endoderme : Feuillet interne de l'embryon qui se met en place au moment de la gastrulation. Il se développera en intestin primitif et en vésicule ombilicale.

G

Gamète : Cellule sexuelle qui permet la reproduction sexuée. Cellule haploïde.

Glycosylation : Liaison covalente d'un glucide à une protéine par réaction enzymatique. La glycosylation rend les protéines plus résistantes à la protéolyse.

H

Hyperkératose palmoplantaire : Développement d'une variété d'eczéma consistant en un épaissement corné squameux des extrémités (paumes des mains et plantes des pieds).

Hypoplasie : Une hypoplasie est un terme qui désigne un arrêt de croissance ou un développement insuffisant d'un organe ou d'un tissu.

M

Ménopause : Fin de la période reproductive de la femme. Elle correspond à l'arrêt des règles, la cessation de l'ovulation et la sécrétion d'hormones sexuelles (œstrogènes et progestérones)

Malignité Solide : Tumeur formée par un amas de cellules localisées. Se distingue des cancers des cellules sanguines circulant dispersés dans l'organisme.

Mésoderme : Feuillet intermédiaire de l'embryon qui se met en place au cours de la gastrulation. Il donnera naissance au rein, aux gonades, etc.

O

Organoïdes crypto-viliaires : Structures multicellulaires tridimensionnelles qui reproduisent in vitro la micro-anatomie d'un organe. Les organoïdes crypto-viliaires sont des organoïdes d'intestin.

P

Palmitylation : Liaison covalente d'un acide gras, comme l'acide palmitique, sur un résidu cystéine d'une protéine d'intérêt. Cet ajout augmente l'hydrophobicité des protéines et contribue à leur association à la membrane. La palmitylation joue un rôle dans le trafic subcellulaire des protéines entre les compartiments membranaires.

Paneth : Cellules exocrines composant l'épithélium de l'intestin grêle.

Plasma Germinatif : Ressources ADN présentes dans le cytoplasme des ovocytes provenant de la mère.

Polycomb : Complexe multiprotéique polycomb qui est nécessaire pour maintenir l'état de répression transcriptionnelle de nombreux gènes tout au long du développement via le remodelage de la chromatine et la modification des histones.

Protéines multipass : Protéines transmembranaires avec plusieurs domaines qui traversent la bicouche phospholipidique.

Proto-oncogène : Gène capable de conférer expérimentalement le phénotype cancéreux à une cellule, à la suite de modifications quantitative ou qualitatives

Protrusion cytoplasmique : Elongation de la membrane cellulaire par le cytosquelette. Permet la mobilité des cellules.

Puberté : Période de transition enfant/adulte: les glandes génitales deviennent fonctionnelles, les hormones sexuelles deviennent actives, les caractères sexuels secondaires se manifestent. Les individus sont fertiles et aptes à la reproduction sexuée.

S

Sexe secondaire : Détermination du sexe secondaire ou caractères sexuels secondaires résultant de l'acquisition de l'activité des hormones sexuelles au moment de la puberté. Il se traduit également par l'acquisition des caractères phénotypiques comme le développement de seins pour la femme ou le développement de la pilosité.

Structures cuticulaires : Chez les insectes, les structures cuticulaires ou sensilles sont des structures pilaires qui servent d'entrée sensorielle. Elles sont localisées sur les antennes, pattes, corps...

Syndrome de Lowe : Maladie rare liée à l'X. Caractérisé par une atteinte multisystémique, anomalies des yeux, du système nerveux et des reins.

T

Tératome bénin : ou Kyste dermoïde, tumeur congénitale qui évolue aux dépens des cellules germinales pluripotentes. Les cellules germinales peuvent se différencier en les trois feuillets embryonnaires. Dans le tératome bénin, les kystes dermoïdes sont composés de structures tissulaires embryo-fœtales.

Tératome mature : Kyste dermoïde, composé de tissus de type matures/adultes. Les kystes sont composés souvent de poils, tissus adipeux, gastro-intestinaux, os et dents.

Traçage cellulaire : Technique qui permet par modification génétique de marquer une cellule *in vivo* avec un fluorochrome (comme la eGFP) à un temps donné et de suivre le devenir de la cellule et ses descendants qui seront également marqués.

Trophoblaste : Couche cellulaire continue formée de fibroblastes qui limite l'embryon au stade morula. Ensuite, le trophoblaste formera le placenta dans la partie fœtale.

Tumeur ovarienne mucineuse : Tumeur endothéliale de l'ovaire associée à une production de mucus.

V

VCP/p97 : Le rôle principal de cette enzyme est de séparer les molécules de protéines de grandes structures cellulaires comme les complexes multi protéiques, les membranes d'organelles et la chromatine.

Z

Zygote : Œuf, cellule issue de la fécondation. Diploïde.

Liste des figures et des tableaux

Introduction : Figures et Tableaux :

Figure 1.1 : Différenciation sexuelle : du sexe génotypique au sexe phénotypique	p 29
Figure 1.2 : Formation de la crête génitale à 9.5 <i>jpc</i>	p 32
Figure 1.3 : Résumé des gènes impliqués dans la régulation de la mise en place de la crête génitale	p 35
Figure 1.4 : Différenciation testiculaire au cours de l'embryogenèse	p 39
Figure 1.5 : Expression de <i>Sry</i> et de <i>Sox9</i> dans la gonade XY au cours de l'embryogenèse, gènes impliqués dans la régulation de la mise en place de la crête génitale.....	p 41
Figure 1.6 : Maintenance de l'expression de <i>Sox9</i> dans les cellules de Sertoli	p 44
Figure 1.7 : Les cellules de Sertoli : centre organisateur de la différenciation testiculaire	p 46
Figure 1.8 : Modèle de vascularisation du testicule	p 51
Figure 1.9 : Modèle de la différenciation de l'ovaire	p 54
Figure 1.10 : Origine des cellules de la granulosa.....	p 56
Figure 1.11 : Trois types de cellules somatiques dans l'ovaire de souris fœtal	p 58
Figure 1.12 : Origine et voies moléculaires des cellules de la thèque	p 61
Figure 1.13 : Folliculogenèse du stade embryonnaire à l'âge adulte.....	p 62
Figure 1.14 : Antagonisme entre les voies mâle et femelle	p 69
Figure 2.1 : Cycles diploïdes des métazoaires au cours de la reproduction sexuée	p 72
Figure 2.2 : Origine des cellules germinales primordiales	p 78
Figure 2.3 : Voie de signalisation des BMPs et spécification des cellules germinales primordiales	p 82
Figure 2.4 : Représentation schématique d'un réseau génétique potentiel pour la spécification des PGC	p 83
Figure 2.5 : Migration des cellules germinales primordiales chez la souris.....	p 96
Figure 2.6 : Reprogrammation épigénétique des cellules germinales au cours de l'embryogenèse chez la souris	p 99
Figure 2.7 : Modèle schématique du Licensing des cellules germinales.....	p 102
Figure 2.8 : Mécanismes potentiels pour l'initiation de la méiose des gonocytes.....	p 105
Figure 2.9 : Régulation de l'ATRA, Biosynthèse et Dégradation	p 107
Figure 2.10 : Modèle schématique de la théorie du MIS et du MSP	p 110
Figure 2.11 : Généralités sur la méiose	p 114
Figure 2.12 : Généralités sur la spermatogenèse	p 117
Figure 2.13 : Généralités sur l'ovogenèse	p 120
Figure 3.1 : Modifications post-traductionnelles et sécrétion des WNTs.....	p 124
Figure 3.2 : Antagonistes et Agonistes sécrétés de la voie WNT/ β -catenin.....	p 128
Figure 3.3 : Le module <i>Lgr5/Rnf43/R-Spondin</i> d'amplification du signal WNT/ β -catenin	p 132
Figure 3.4 : La voie de signalisation Wnt/ β -caténine canonique.....	p 135
Figure 3.5 : La β -caténine permet de lever la répression de GRG pour activer la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation WNT/ β -caténine	p 137
Figure 3.6 : Multiples voies de signalisation Wnt	p 141
Figure 3.7 : Robustesse des cellules souches	p 146
Figure 3.8 : Prolifération symétrique et asymétrique des cellules souches	p 148
Figure 3.9 : Mécanismes de régulation de la pluripotence par β -catenin	p 153
Figure 3.10 : La voie de signalisation WNT/ β -catenin et les cellules souches cancéreuses	p 154

Figure 4.1 : La prolifération des progéniteurs de l'épithélium cœlomique est réduite dans les mutants <i>Wnt4^{-/-} ; Rspo1^{-/-}</i>	p 159
Figure 4.2 : Expression d' <i>Axin2</i> , rapporteur de la signalisation WNT/ β -catenin dans les gonades du modèle murin <i>Axin2-LacZ</i>	p 161
Figure 4.3 : Développement d'un ovo-testicule chez le mutant XX <i>Rspo1^{-/-}</i>	p 163
Figure 4.4 : Les cellules de la pré-granulosa se différencient plus tôt dans le mutant <i>Wnt4^{-/-}</i>	p 166
Figure 4.5 : Les cellules germinales déficientes pour <i>Rspo1</i> ressemblent à des pré-spermatogonies en phase G0-G1.....	p 170
Figure 4.6 : Détection par immunofluorescence de β -catenine active dans les gonades XY,XX et XX <i>Rspo1^{-/-}</i>	p 172

Tableaux :

Tableau 3A : La voie WNT/PCP et ses implications chez les vertébrés.....	p 143
Tableau 3B : La voie WNT/ Ca^{2+} et ses implications chez les vertébrés	p 144
Tableau 3C : Les différents types de cellules souches	p 147
Tableau 3D : Résumé d'études sélectionnées démontrant les effets de la signalisation WNT/ β -catenin sur les cellules souches provenant de différents modèles biologiques.....	p 150

Matériel et Méthodes : Figures et Tableaux :

Tableaux :

Tableau A : Primers de géotypage des modèles murins.....	p 180
Tableau B : Anticorps utilisés	p 182
Tableau C : Amorces Q-PCR.....	p 183

Résultats, Discussion et Perspectives : Figures et Tableaux :

Résultat 1 : L'ablation somatique de β -catenin modifie le destin des cellules germinales XX :

Figure 1 : La <i>WT1-CreERT2</i> est efficace pour réaliser l'ablation du gène <i>Ctnnb1</i> dans la gonade XX	p 189
Figure 2 : Les embryons XX à 13.5 <i>jpc</i> invalidés pour <i>Ctnnb1</i> dans les cellules somatiques ne présentent pas d'inversion de sexe.....	p 190
Figure 3 : Les cellules germinales ont besoin d'un signal provenant de l'environnement somatique pour initier la méiose	p 194

Résultat 2 : A β -catenin/OCT3/4 regulatory loop triggers exit from pluripotency in primordial germ cells :

Figure 1 : WNT/ β -catenin signalling is activated in post-migratory PGCs.....	p 234
Figure 2 : β -catenin is required for primordial germ cell differentiation.....	p 235
Figure 3 : Genetic ablation of <i>Ctnnb1</i> impairs PGC proliferation and triggers a precocious meiosis initiation.	p 236
Figure 4 : β -catenin stabilization through <i>GSL3β</i> ablation leads to the maintenance of pluripotency in PGCs.....	P 237
Figure 5 : In absence of WNT/ β -catenin signalling, <i>POU5F1</i> is localized at the membrane of germ cells.	p 238
Figure 6 : <i>POU5F1</i> and β -catenin associate in multiproteic complexes during germ cell differentiation.	p 239
Figure 7 : <i>ZNRF3</i> is required for proper germ cell differentiation.....	p 240

Sup. Figure 1 : WNT/ β -catenin signalling is activated in post-migratory PGCs	p 241
Sup. Figure 2 : Ctnnb1 deletion in the primordial germ cells did not affect the size of the animals nor the somatic cell differentiation.	p 242
Sup. Figure 3 : Validation of the Sox2-CreER ; Ctnnb1flox/flox mouse model for germ cell-specific deletion of Ctnnb1	p 243
Sup. Figure 4 : β -catenin is required for primordial germ cell differentiation.	p 244
Sup. Figure 5 : Validation of the purity of germ cell population collected after Fluorescence-Activated Cell Sorting.	p 245
Sup. Figure 6 : β -catenin stabilization through $GSL3\beta$ ablation leads to the maintenance of pluripotency and proliferation in PGCs.....	p 246
Sup. Figure 7 : Proposed model for WNT/ β -catenin mechanism of action during germ cell exit from pluripotency and differentiation.	p 247
 <u>Discussion</u> :	
Figure 1 : POU5F1 et β -catenin sont exprimés dans les tumeurs des cellules germinales de l'ovaire	p 256
 Schéma de conclusion	p 261

Table des matières

Résumé.....	3
Summary	4
Remerciements.....	7
Tables des abréviations	9
Lexique.....	15
Liste des figures et des tableaux.....	19
Introduction : Figures et Tableaux :	19
Matériel et Méthodes : Figures et Tableaux :.....	20
Résultats, Discussion et Perspectives : Figures et Tableaux :	20
Table des matières.....	23
Introduction	25
Chapitre 1 – Formation de la gonade et détermination du sexe chez la souris.....	27
Développement de la gonade indifférenciée	31
Différenciation testiculaire	37
Différenciation ovarienne.....	53
Antagonisme entre les deux voies	67
Chapitre 2 – Origine et mise en place de la lignée germinale	71
Approche historique et origine de la mise en place de la lignée germinale.....	77
Spécification de la lignée germinale.....	79
Profil d’expression génique des cellules germinales primordiales.....	85
Gènes associés à la prolifération et à la survie des cellules germinales primordiales	89
Migration des cellules germinales primordiales.....	93
Reprogrammation épigénétique	97
Licensing des cellules germinales : le passage de cellules germinales primordiales à cellules compétentes à la gamétogénèse.....	101
Les cellules germinales : détermination du sexe et entrée en méiose.....	103
Des gonocytes, aux gamètes, à la fécondation	113
Chapitre 3 – La voie de signalisation WNT/ β -catenin	121
Quels sont les acteurs de la voie WNT/ β -catenin ?	123
La voie WNT/ β -catenin canonique	133
La voie WNT/ β -catenin non canonique	141
La voie WNT/ β -catenin et les cellules souches.....	145
Chapitre 4 – La voie WNT/ β -catenin dans l’ovaire en développement	157
Historique.....	157
<i>R-spondin1</i> et <i>Wnt4</i> dans la formation de la gonade bipotentielle	159
<i>R-spondin1</i> et <i>Wnt4</i> dans la différenciation sexuelle somatique	161
L’absence de <i>R-spondin1</i> et <i>Wnt4</i> induit une inversion de sexe de type mâle XX.	163

Voie WNT/ β -catenin et cellules germinales : prolifération, différenciation sexuelle et méiose	169
Objectifs des travaux	175
Matériel et méthodes	179
Modèles Murins :	179
Analyses immunohistochimiques	180
Analyses par RT-quantitative PCR (RT-qPCR).....	182
Analyses biochimiques.....	183
Isolation des cellules germinales et culture cellulaire	184
Résultats	185
Résultat 1 : L'ablation somatique de β -catenin modifie le destin des cellules germinales XX.....	187
Ablation de la voie Wnt/ β -catenin spécifiquement dans les cellules somatiques de la gonade	187
Résultat 2 : A β -catenin/OCT3/4 regulatory loop triggers exit from pluripotency in primordial germ cells.	197
Discussion générale et perspectives	249
Ablation génétique de <i>Ctnnb1</i> dans les cellules somatiques WT1-positives.....	250
Différenciation des cellules germinales, acide rétinoïque et activité WNT/ β -catenin.....	252
Voie WNT/ β -catenin et accessibilité de la chromatine : de nouvelles perspectives de recherche... ..	255
Voie WNT/ β -catenin, pluripotence et tumeurs des cellules germinales :	256
Conclusions	259
.....	263
Annexes.....	263
Annexe 1 : Constitutive WNT/CTNNB1 activation triggers spermatogonial stem cell proliferation and germ cell depletion	265
Annexe 2 : Retinoic Acid signalling is dispensable for meiosis initiation in female mice	279
Annexe 3 : R-spondin2 signaling is required for oocyte driven intercellular communication and follicular growth	313
Bibliographie.....	355

Introduction

Chapitre 1 – Formation de la gonade et détermination du sexe chez la souris

« La sexualisation représente le mécanisme qui est à l'origine des causes et des modalités de la différenciation sexuelle qui marque, dans une espèce animale, chaque individu soit du type masculin, soit du type féminin. » Encyclopédie Universalis.

Chez les mammifères, la détermination du sexe est un processus essentiel pour assurer la formation des glandes sexuelles et la reproduction sexuée, constituant à ce jour un phénomène biologique fascinant. Depuis très longtemps cette question intrigue les scientifiques. Avant la découverte des chromosomes sexuels, diverses hypothèses sur l'influence de la température, l'alimentation et d'autres ont été imaginées pour expliquer la différence entre les deux sexes.

En 1888, Heinrich Wilhelm Waldeyer a observé pour la première fois des « corps en forme de cordes » dans les noyaux cellulaires, qu'il a appelés « chromosomes ». En 1891, Herman Henking fait lui la découverte chez le *Pyrrhocoris apterus* (insecte : la pirole de feu) que certains spermatozoïdes contenaient 12 chromosomes tandis que d'autres en contenaient 11. Il a ainsi initié la découverte du chromosome X, nommé "élément X" car mystérieux.

Ce n'est qu'en 1905 que Nettie Maria Stevens a mis en lumière la présence d'un chromosome plus petit que l'autre chez les mâles *Tenebrio molitor* (ver de farine) mais pas chez les femelles. De cette découverte, elle a conclu que ce chromosome appelé chromosome « Y » plus court devait être responsable de la détermination du sexe mâle (N.M. Stevens : Studies in Spermatogenesis with Especial Reference to the "Accessory Chromosome." (1905)).

Depuis, pour expliquer l'étiologie des pathologies de patients présentant des troubles du développement sexuel (Disorders/Differences of Sexual Development), les scientifiques ont initié des études cytogénétiques et moléculaires afin de mieux comprendre les mécanismes de la différenciation sexuelle.

Les DSD sont des maladies rares dont la prévalence est mal connue, estimée à globalement 1,7 % des naissances vivantes, correspondant à 1/300 naissances en ce qui concerne les malformations génitales "légères" (hypospade, cryptorchidie), correctibles chirurgicalement, et à 1/4 000 naissances pour les pathologies les plus sévères telles que les inversions de sexe (Ono et Harley 2013; Bessiène, Lombès, et Bouvattier 2018).

Les présentations cliniques de ces maladies sont très hétérogènes, ce qui a pour conséquence une prise en charge variable et un diagnostic moléculaire qui n'est souvent pas possible.

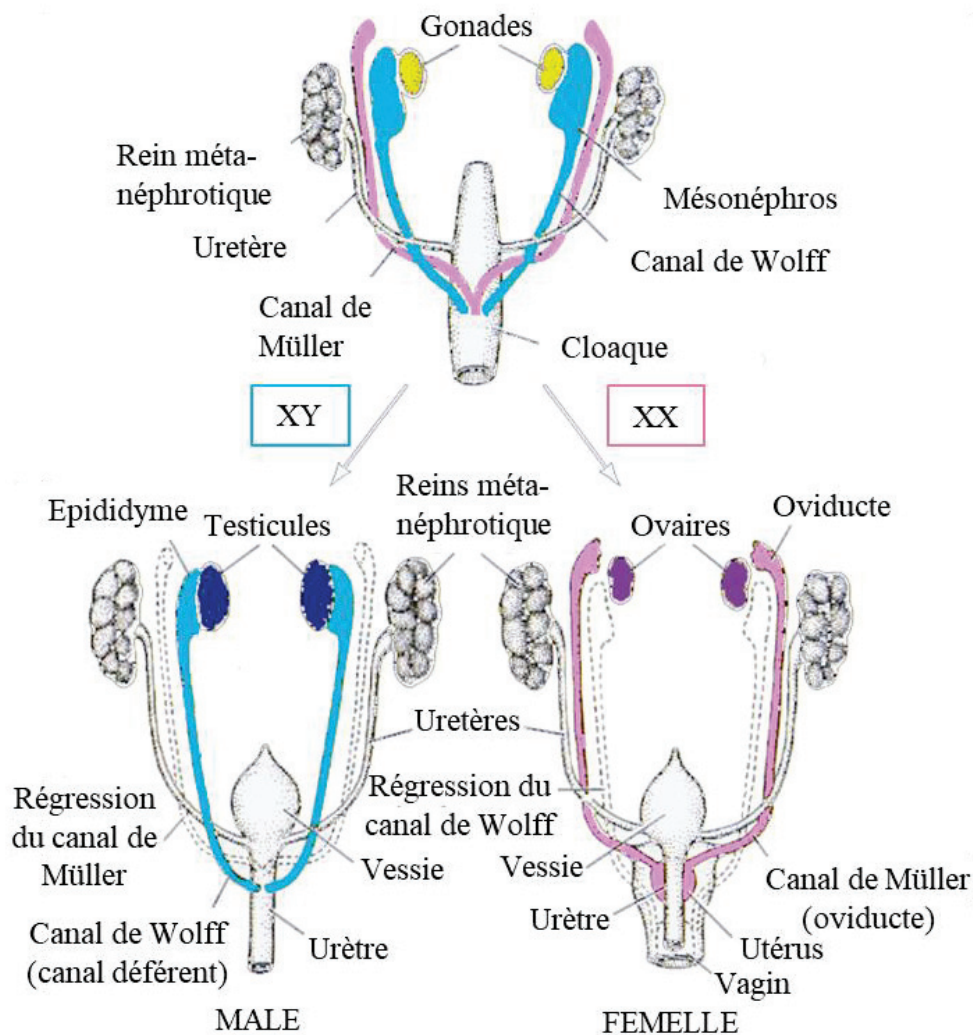
Les troubles du développement sexuel (DSD) sont un groupe de pathologies où les gonades, et le tractus génital ne se développent pas correctement.

En 2005, lors d'une conférence à Chicago, un consensus a été établi pour classer les DSD. La classification est basée sur le profil chromosomique des patients :

- **DSD chromosomiques** : pathologies avec une altération d'un chromosome ou une altération du caryotype. Pour exemple : syndrome de Turner 45, X; syndrome de Klinefelter 47, XXY; dysgénésies gonadiques 45, X/46, XY.
- **DSD 46, XY** : les patients présentent des anomalies du développement testiculaire (dysgénésies gonadiques complètes et incomplètes, régression testiculaire), des anomalies de la synthèse de testostérone (insensibilités partielles et complètes aux androgènes, syndromes de persistance des dérivés müllériens) et peuvent présenter un phénotype femelle.
- **DSD 46, XX** : les patients présentent des anomalies du développement ovarien (dysgénésies gonadiques, inversion de sexe partielle type ovo-testiculaire), un excès d'androgènes et peuvent présenter un phénotype mâle.

Les DSD sont un problème de santé publique majeur, entraînant non seulement des pathologies qui regroupent l'intersexualité, l'infertilité, l'insuffisance hormonale, les cancers gonadiques mais elles sont aussi liées à des détresses psychologiques liées aux problèmes d'identité et d'intégration sociale.

Figure 1.1 : Différenciation sexuelle : du sexe génotypique au sexe phénotypique



Au cours de la détermination du sexe, la gonade bipotentielle va se différencier soit en un ovaire (individus XX), soit en un testicule (individus XY). Le sexe génétique est établi dès la fécondation par la transmission paternelle du chromosome X ou Y. Les caractères primaires* se mettent en place au cours du développement embryonnaire, les premiers signes visibles de dimorphisme sexuel apparaissent. Enfin, la détermination du sexe secondaire* est établie au cours de la puberté* avec la sécrétion d'hormones nécessaires à la différenciation complète de l'embryon en mâle ou en femelle.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le modèle murin pour l'étude de la différenciation sexuelle. Nous utilisons ce modèle au laboratoire en raison de la proximité génétique entre la souris et l'homme (99% d'homologie). Nous disposons également des technologies de génie génétique qui permettent de manipuler facilement le génome de la souris

afin de produire des animaux transgéniques adaptés à l'étude fonctionnelle des gènes. Cependant, il est nécessaire de noter que de plus en plus d'études portant sur la détermination du sexe utilisent d'autres modèles animaux comme les caprins ou les grands ruminants dont la physiologie se rapproche plus de celle de l'Homme. Quand chez la souris certaines étapes prennent quelques jours (3-4 jours), chez la chèvre ou les grands ruminants, la détermination du sexe se passe en plusieurs semaines comme chez l'Homme, ce qui permet de mieux décortiquer chaque étape.

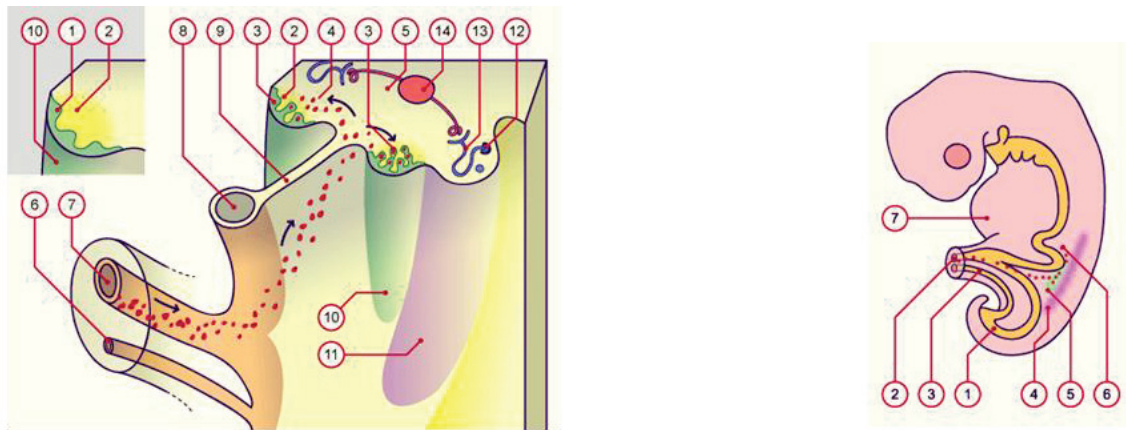
Développement de la gonade indifférenciée

La détermination du sexe est le seul processus développemental par lequel, à partir d'un organe initialement bipotentiel, se différencient deux organes différents, le testicule et l'ovaire. Chez la souris, la gestation dure entre 18 et 21 jours. La période embryonnaire ou âge embryonnaire correspond au temps écoulé entre la conception et la naissance. Elle est quantifiée en jours après l'accouplement que l'on nomme jours *post coitum* (*jpc*). Le développement de la gonade commence à 9.5 *jpc* et jusqu'à 11.5 *jpc*, celle-ci est morphologiquement indifférenciable entre les deux sexes.

Au cours du développement embryonnaire, la cavité coelomique est composée par le mésoderme intermédiaire. Le mésoderme intermédiaire est segmenté en trois parties : le pronéphros qui va se différencier en glandes surrénales ; le mésonéphros, futur rein chez les mammifères ; et le métanéphros, une partie plus postérieure qui participe à la formation des reins. Le mésonéphros est bordé par l'épithélium coelomique qui formera les futures gonades.

Les crêtes génitales (ou gonades bipotentiels, futures gonades) dérivent des feuilletts mésodermiques intermédiaires (Figure 1.2). Elles se forment par un épaissement de l'épithélium coelomique à la surface du mésonéphros. Elles ont une structure longitudinale, située de part et d'autre de l'axe médian de l'embryon, accolée à la crête urogénitale. La formation des crêtes génitales est initiée à 9.5 *jpc* (équivalent chez l'Homme environ 4 semaines). La prolifération des cellules de l'épithélium coelomique, combinée au recrutement de cellules mésenchymateuse du mésonéphros (Schmahl et Capel 2003), va constituer l'ébauche génitale de la gonade.

Figure 1.2 : Formation de la crête génitale à 9.5 *jpc*



- | | | |
|---|----------------------------------|------------------------------------|
| 1) Epithélium coelomique en prolifération | 8) Intestin | 1) Intestin postérieur |
| 2) Epaissement du mésenchyme | 9) Mésentère dorsal | 2) Canal vitellin |
| 3) Cordons sexuels | 10) Crête génitale | 3) Allantoïde |
| 4) Cellules germinales primordiales | 11) Crête urinaire | 4) Crête urinaire (rose) |
| 5) Mésenchyme | 12) Canal mésophrotique de Wolff | 5) Crête génitale (vert) |
| 6) Allantoïde | 13) Canalicules mésophrotiques | 6) Cellule germinales primordiales |
| 7) Canal vitellin | 14) Aorte | |

Modifié du site <http://www.embryology.ch/>

L'ébauche génitale est formée par deux populations cellulaires d'origine embryologique différente : les précurseurs des cellules somatiques et les cellules germinales primordiales.

La population des précurseurs des cellules somatiques se délamine à partir de l'épithélium coelomique, entre dans le mésenchyme et prolifère entre 10.5 et 12.0 *jpc*. Les mécanismes de prolifération et délamination restent à ce jour encore obscurs. Cependant, le transcriptome et la capacité proliférative de ces précurseurs ne sont pas identiques dans les deux sexes, ce qui suggère que malgré une origine commune les précurseurs ont un destin différent (Jameson et al. 2012). Ces progéniteurs somatiques vont se différencier en cellules de soutien, nourricières des cellules germinales (cellules de Sertoli dans l'embryon mâle et cellules de la granulosa dans l'embryon femelle) et en cellules interstitielles, productrices d'hormones (cellules de Leydig dans l'embryon mâle et cellules de la thèque dans l'embryon femelle) (Karl et Capel 1998; Albrecht et Eicher 2001).

L'étude de modèles murins génétiquement modifiés a permis de décortiquer les voies génétiques impliquées dans le développement du bourgeon génital (Figure 1.3).

Initiation de la formation du bourgeon génital

Le développement complet de la crête génitale est initié par le facteur de transcription *Gata4*, dont le mutant perte-de-fonction présente une absence complète de crête génitale (Hu, Okumura, et Page 2013). En effet, le facteur de transcription *Gata4* est exprimé dans l'épithélium cœlomique de la crête génitale. Son expression est détectée en vague qui se diffuse dans la direction antéro-postérieure (A-P). L'épithélium à la suite de l'expression de *Gata4*, présente un épaissement, passant d'une monocouche cellulaire à une couche pluricellulaire suivant le schéma A-P. Les embryons déficients pour *Gata4* ne présentent aucun signe d'initiation gonadique et l'épithélium cœlomique reste en monocouche morphologiquement indifférenciée.

De plus, dans ces mutants, l'expression des premiers marqueurs gonadiques, *Lim Homeobox Protein 9 (Lhx9)* et *Steroidogenic Factor 1 (Sfl* ou connu aussi sous le nom *Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1 : Nr5a1*) est absente, indiquant que *Gata4* est nécessaire pour initier la formation de la crête génitale chez les embryons XX et XY.

Le gène *Sfl* code pour la protéine NR5A1 ou SF1 qui se lie à des récepteurs nucléaires. Elle comprend deux domaines doigts de zinc en position N-terminale qui sont responsables de la liaison à l'ADN.

Le gène *Wilms tumour gene 1 (Wt1)* code pour la protéine WT1, un facteur de transcription à doigts de zinc (quatre motifs localisés à l'extrémité C-terminale) et un domaine de liaison à l'ADN (localisé à l'extrémité N-terminale).

Maintenance de la crête génitale

L'implication des gènes *Sfl* et *Wt1* a été décrite pour la première fois chez des patients présentant une dysgénésie gonadique.

Des études d'inactivation génique chez la souris ont montré que *Sfl* et *Wt1* étaient nécessaires au maintien des crêtes génitales. Chez les souris déficientes pour le gène *Sfl*, les crêtes génitales se forment jusqu'à 11.5 *jpc* et dégèrent ensuite très rapidement (Luo, Ikeda, et Parker 1994).

De même, à 11.5 *jpc*, les embryons déficients pour le facteur de transcription *Wt1* présentent une formation des crêtes génitales suivie d'une dégénération rapide (Kreidberg et al. 1993).

Ainsi les embryons de souris homozygotes pour une mutation nulle dans l'un de ces gènes ont un épithélium monocouche cellulaire qui présente un épaissement initial mais régresse avant que la crête génitale ne soit complètement formée. Ainsi la carence en *Sfl* ou en *Wt1* entraîne un défaut de la formation de la crête génitale. La maintenance de la crête génitale nécessite

donc les gènes *Sfl* (Wilhelm et Englert 2002) et *Wtl* (Kreidberg et al. 1993; Hammes et al. 2001).

Prolifération cellulaire des progéniteurs de la crête génitale

A 11 *jpc*, la monocouche cellulaire de la crête génitale est le siège des précurseurs somatiques qui présentent une prolifération très forte. *Lhx9* agirait en amont de *Sfl*. Une mutation homozygote de ce gène chez la souris entraîne une formation discrète de la gonade suivie d'un arrêt de la prolifération (Birk et al. 2000; Mazaud et al. 2002).

L'ébauche génitale est le siège d'une prolifération forte, et la voie de signalisation de l'Insuline est décrite comme un acteur nécessaire à cette prolifération de l'épithélium cœlomique. Chez des souris mutées pour trois gènes de la voie de l'insuline : *Insulin receptor (Ir)*, *Insulin Like Growth Factor 1 Receptor (Igf1r)* et *Insulin Receptor-related Receptor (Irr)*, on observe la formation des gonades mais ces gonades sont hypoplasiques à 12.5 *jpc*. A 18.5 *jpc*, ces mutants sont également caractérisés par une inversion de sexe femelle XY et un retard de croissance ovarienne. En effet en l'absence des ces trois gènes, l'épithélium cœlomique ne prolifère plus suffisamment et le manque de précurseurs somatiques entraîne une formation anormale des gonades XY et XX (Nef et al. 2003).

Récemment, les gènes *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4 (Wnt4)* et *Roof Plate-Specific Spondin-1 (Rspo1)* ont été décrits comme des régulateurs importants de cette étape de la différenciation de la gonade. Les mutants XY et XX déficients pour ces deux gènes présentent une diminution de la prolifération de l'épithélium cœlomique et développent de gonades hypoplasiques (Chassot et al. 2012).

Migration des progéniteurs qui forment l'ébauche génitale

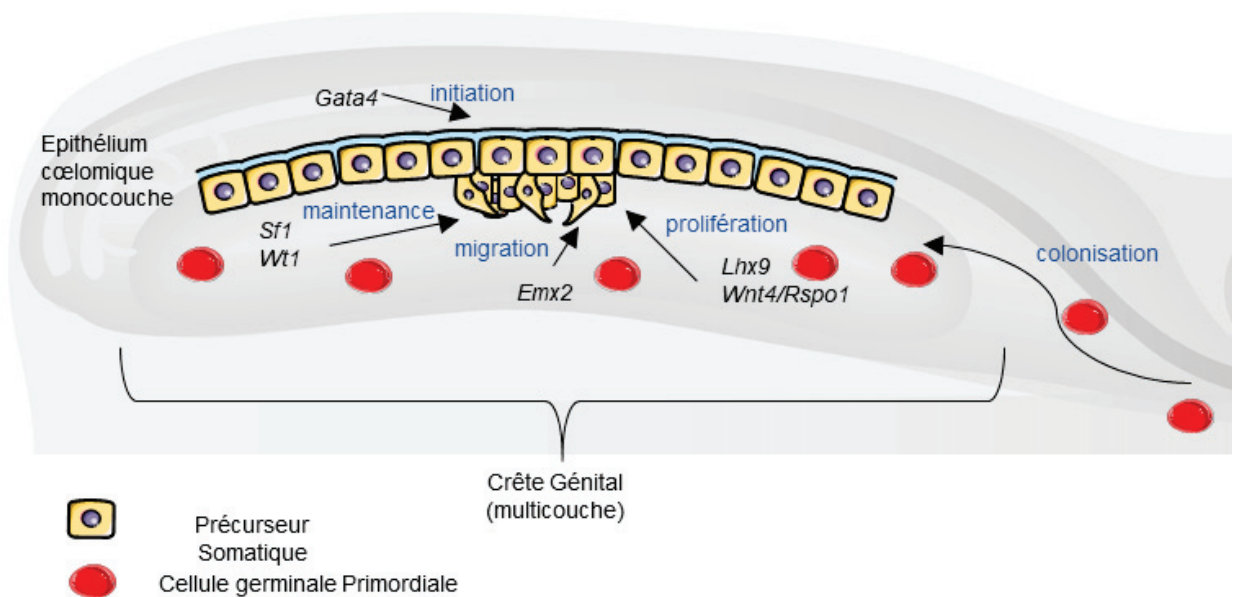
Enfin d'autres gènes impliqués dans l'établissement des crêtes génitales ont été décrits. L'ablation génétique du gène *Empty Spiracles Homeobox 2 (Emx2)* chez la souris induit différentes malformations au niveau embryonnaire comme une absence de reins, uretères et organes génitaux externes. *Emx2* est impliqué dans la migration des cellules épithéliales à travers la membrane basale pour former une deuxième couche de cellules de type mésenchymateux juxtaposés sur l'épithélium cœlomique. Les cellules vont s'accumuler afin de

former une structure cellulaire multicouche et former l'ébauche génitale (N. Miyamoto et al. 1997).

Colonisation de la crête génitale

La seconde population cellulaire composant les crêtes génitales sont les cellules germinales primordiales. Ces cellules sont d'origine épiblastique et leur ségrégation est précoce. Elles colonisent le bourgeon génital entre 8.5 et 9.5 *jpc* afin de former un pool de cellules germinales primordiales. Ces cellules vont se différencier sexuellement avant d'initier la méiose et devenir des gamètes matures (ovocytes ou spermatozoïdes). Nous reviendrons sur la colonisation de la crête génitale et le développement des cellules germinales dans le chapitre II " Origine et mise en place de la lignée germinale ".

Figure 1.3 : Résumé des gènes impliqués dans la régulation de la mise en place de la crête génitale



Chez les mammifères, l'existence de deux sexes complique la génétique et la biologie du développement embryonnaire : elle nécessite une stratégie d'embryogenèse capable de générer deux types d'organismes matures physiologiquement différents dans chaque sexe. Ainsi après une origine commune, les progéniteurs gonadiques mâles et femelles se lancent dans des trajectoires de développement différentes. Cette divergence est marquée par une balance entre réseaux transcriptionnels se faisant soit en faveur d'un déterminisme mâle (différenciation testiculaire) soit en faveur d'un déterminisme femelle (différenciation ovarienne).

Différenciation testiculaire

Dans les années 1950, le chromosome Y était déjà considéré comme porteur d'une fonction déterminante pour la différenciation sexuelle mâle, mais des efforts importants ont été déployés pour identifier le **Testis-Determining Factor** (*TDF* chez l'Homme, *Tdy* chez la souris). L'analyse de patients de phénotype femelle et de caryotype 46, XY a mis en évidence que le *TDF* est localisé au niveau du bras court du chromosome Y (Jacobs et Ross 1966).

En 1987, une protéine à doigt de zinc (*ZFY*) a été identifiée comme un candidat pour être le *TDF* chez l'Homme (Page et al. 1987). Cependant, l'étude chez la souris a mis en évidence que *Zfy* n'était pas exprimé dans les cellules somatiques du testicule embryonnaire. De plus, quatre patients XX de phénotype mâle présentant des degrés différents de masculinisation étaient dépourvus de *ZFY* (Koopman et al. 1989; M. S. Palmer et al. 1989), invalidant le rôle de *ZFY* en tant que déterminant mâle. En revanche, ces quatre patients présentaient tous la région 35kb du chromosome Y.

Cette région est une des rares régions conservées du chromosome Y chez les mammifères, aboutissant à l'hypothèse que cette région devait contenir le gène *TDF*. Le séquençage a révélé un cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour un gène à un seul exon, appelé "Sex determining region of the Y" (*SRY* chez l'homme, *Sry* chez la souris) (Gubbay et al. 1990; Sinclair et al. 1990; Koopman et al. 1991).

La preuve définitive du rôle de *Sry* a été obtenue par la création d'un modèle murin transgénique XX portant le gène *Sry*. "Randy" est la première souris mâle XX, qui à l'âge adulte avait un appareil génital externe et un système reproducteur de type mâle. Cependant, Randy n'était pas capable de produire des spermatozoïdes (Koopman et al. 1991). Pendant la prolifération des progéniteurs de la crête génitale, la constitution chromosomique des cellules somatiques va orienter directement ou indirectement le destin sexuel de la gonade. Les individus XY, porteurs du chromosome Y, expriment le gène *Sry*, un gène de la famille *Sox* transmis par le père, qui est l'initiateur du programme mâle.

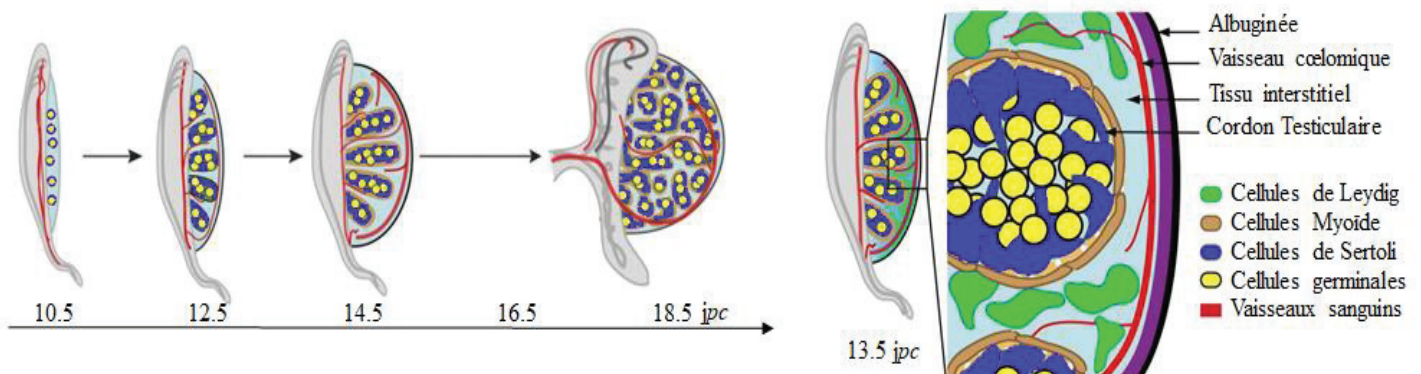
La protéine SRY est composée de 204 acides aminés possédant un domaine High Mobility Group (HMG). Le domaine HMG permet à la protéine de se lier à l'ADN et d'initier un changement de la chromatine (courbure). La modification de la conformation de la chromatine permet le rapprochement et l'interaction avec d'autres facteurs de transcription et de déclencher l'expression de gènes cibles de la formation du testicule.

Ainsi la découverte du gène *Sry*, il y a un quart de siècle, a fourni un point d'entrée aux études moléculaires du développement testiculaire, et de nombreux laboratoires ont décidé d'orienter leurs travaux sur l'étude du déterminisme mâle.

La différenciation testiculaire présente trois étapes de transformation morphologique majeures :

- 1) Différenciation et expansion des cellules de Sertoli ;
- 2) Différenciation des autres cellules somatiques du testicule : les cellules myoïdes et les cellules de Leydig;
- 3) Organisation du testicule : vascularisation et formation des cordons testiculaires.

Figure 1.4 : Différenciation testiculaire au cours de l'embryogenèse



Modifié de (Svingen et Koopman 2013)

Différenciation et expansion des cellules de Sertoli : « centre organisateur de la différenciation testiculaire »

Chez l'Homme, comme chez d'autres mammifères, l'expression de *SRY* est détectée pendant la période embryonnaire par un pic d'expression lors de la période de la détermination du sexe puis son expression persiste à faible niveau jusqu'à l'âge adulte. Chez la souris, le gène *Sry* est exprimé par les précurseurs somatiques à 10 jpc, avec un pic d'expression à 11.25 jpc, puis son expression décroît. *Sry* est exprimé dans les précurseurs de la crête génitale jusqu'à la différenciation des cellules de Sertoli. Il est également exprimé à l'âge adulte dans les cellules germinales méiotiques et post méiotiques. Chez la souris, ce n'est qu'une fois que les précurseurs somatiques XY ont colonisé la gonade que l'expression de *SRY* est activée

(Bullejos et Koopman 2005), donnant naissance aux cellules de Sertoli mais aussi aux cellules intersticielles du testicule.

Régulation de l'expression de *Sry*

Les précurseurs exprimant SRY sont d'abord observés dans le tiers médian des crêtes génitales, avec une expansion de l'expression de ce facteur vers les pôles de la gonade. Ce schéma d'expression est également observé pour d'autres gènes exprimés plus tôt chez les embryons XX et XY (H. J. Lee et al. 2009), laissant supposer que cette vague d'expression de SRY dépend d'une régulation fine de combinaisons appropriées de facteurs de transcription présents dans différentes parties de la gonade à différents moments.

Différentes études chez la souris ont pu mettre en évidence différents gènes en amont de *Sry* qui seraient impliqués dans sa régulation, tels que les gènes *Ir* et le *Igf1r*, *Sfl*, *Chromobox 2* (*Cbx2*), *MAP kinase*, *Gata4* et *Friend of GATA* (*Fog2*), ainsi que des protéines impliquées dans la modification de la chromatine comme CREB et p300 (Carré et al. 2018).

Chez des souris mutées pour les gènes *Insr* et *Igf1r*, on observe une diminution de la prolifération des progéniteurs somatiques dans les embryons XX et XY avant la détermination du sexe. La diminution des progéniteurs XY entraîne également une réduction de l'expression du gène *Sfl* se répercutant sur le pic d'expression de *Sry*, ayant pour conséquences une inversion du sexe gonadique de type femelle chez les individus XY pendant l'embryogenèse, et un retard dans la différenciation ovarienne des individus XX (Nef et al. 2003; Pitetti et al. 2013).

Le gène *Sfl* est un bon candidat pour être un gène activateur de *Sry*. *Sfl* par l'intermédiaire du gène *Cbx2*, composant du complexe multiprotéique Polycomb*, régule positivement l'expression de *Sry* (Biason-Lauber et al. 2009). Des mutations abolissant la fonction du gène *Cbx2* ont pour conséquence une expression de *Sry* quasi nulle. De plus, des études *in vitro* ont montré que CBX2 active le promoteur de *Sfl*, alors que SF1 se lie et active le promoteur de *SRY* chez l'Homme et le porc (De Santa Barbara et al. 2001). Il a également été décrit chez des patients humains des mutations hétérozygotes dans *SF1* pouvant induire une inversion du sexe de type femelle XY, indiquant que SF1 est nécessaire pour la régulation des gènes essentiels à la voie mâle (Sekido et Lovell-Badge 2008).

De plus, le remodelage de la chromatine est important dans la régulation de *Sry*. En effet la protéine CREB et son paralogue p300 (CBP/p300) sont des histones/lysine acetyltransferases qui contrôlent l'expression des gènes en modifiant les protéines associées à la

chromatine. Un modèle murin perte de fonction pour l'un ou l'autre de ces gènes montre une inversion partielle du sexe femelle XY. Ces données suggèrent que CBP/p300 contrôle l'acétylation des histones au locus *Sry* et impliquent l'épigénétique comme un nouvel élément dans la détermination du sexe (Carré et al. 2018).

La voie des MAP kinases est également impliquée dans la régulation de l'expression de *Sry*. Les analyses génétiques chez la souris ont révélé le rôle dans la différenciation testiculaire de la protéine kinase activée par le mitogène (MAPK): la perte ciblée des kinases MAP3K4 et p38 MAPK provoque une inversion complète du sexe gonadique embryonnaire XY (Gierl et al. 2012). La voie des MAP kinases est en amont et est impliqué dans l'expression de *Gata4*. La fonction *in vivo* normale des facteurs *Gata* chez les vertébrés et la drosophile nécessite une interaction physique avec les protéines à doigts de zinc multitype de la famille FOG (Friend of GATA). Un membre de la famille FOG, FOG2 (ami de GATA2), est exprimé dans la gonade embryonnaire de souris dès 11.5 *jpc*.

Chez la souris, l'analyse des mutants *Fog2*^{-/-} et *Gata4*^{ki/ki} (*Gata4*^{ki} est une modification générique gain de fonction possédant une substitution d'acide aminé V217G qui annule l'interaction entre GATA4 et FOG2) a montré à 11.5 *jpc* que la différenciation de la crête génitale était normale mais indique que le développement des testicules est bloqué.

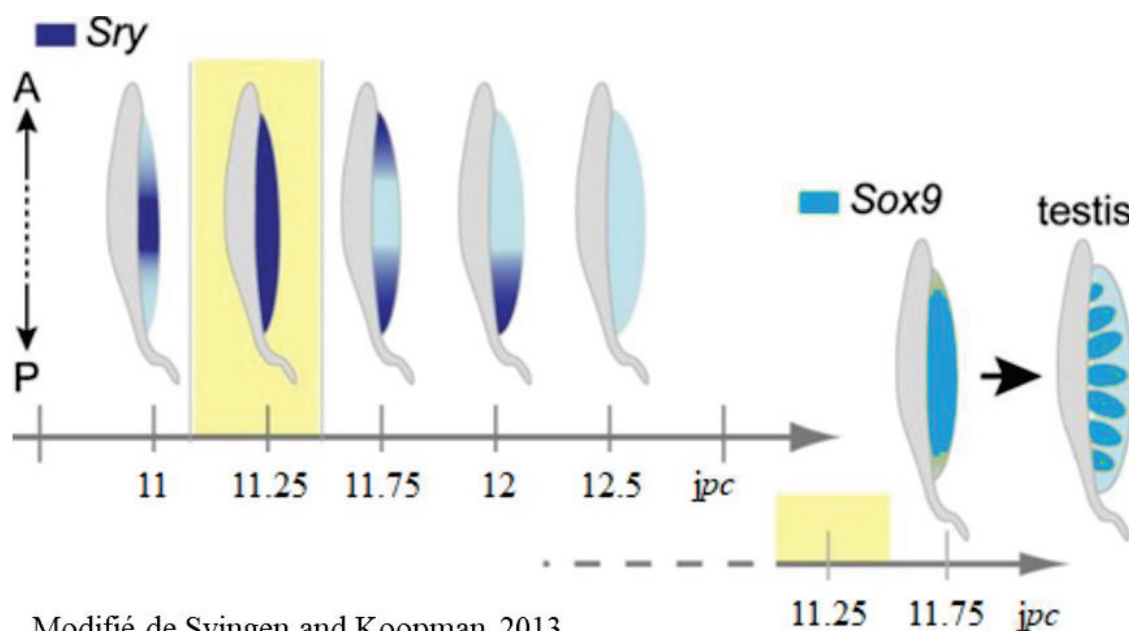
Dans ces mutants, l'expression de WT1 semble tout à fait normale. En effet, une étude rapporte une coopération entre WT1 et le facteur de transcription GATA4 (Y. Miyamoto et al. 2008). Cette coopération améliore non seulement nettement l'activation du promoteur *Sry* mais elle cible également le promoteur du gène *Anti-Mullerian Hormone (Amh)* impliqué dans la différenciation du sexe mâle, une notion que je développerai plus loin.

Bien que l'on ne sache pas exactement comment se produit l'expansion de l'expression de SRY d'un pôle de la gonade à l'autre, cette brève fenêtre est indispensable à la différenciation des cellules de Sertoli. Le moindre délai d'expression de *Sry* entraîne la différenciation de la crête génitale en ovo-testicule ou ovaire (Eicher et al. 1982; Hiramatsu et al. 2009).

Induction de l'expression de *Sox9*

Le pic d'expression de SRY dans les cellules précurseurs induit l'expression du gène *Sry HMG box related gene 9* ou *SRY box 9 (Sox9)* dans ces cellules, qui sont ensuite appelées cellules pré-Sertoli. La régulation à la hausse de SOX9 suit un schéma centre-pôle similaire à celui de SRY, bien que 10 heures plus tard (Bullejos et Koopman 2005).

Figure 1.5 : Expression de *Sry* et de *Sox9* dans la gonade XY au cours de l'embryogenèse



SOX9 est exprimé dans les précurseurs des cellules de Sertoli à 11.5 jpc. Une étude récente a montré que l'enhancer 13 (*Enh13*), un élément de 557pb situé à 565 kb du promoteur de *Sox9*, est essentiel pour initier le développement des testicules de souris. La suppression de cet élément chez les souris induit une inversion de sexe de type femelle XY avec des niveaux d'expression du gène *Sox9* équivalents à ceux des souris XX. Ces données indiquent que l'Enh13 initierait l'expression de *Sox9* (Gonen et al. 2018).

De plus, un complexe protéique composé de SRY et de SF1 se fixe sur la région régulatrice amplificatrice Testis-specific Enhancer of *Sox9* Core Element (TESCO) qui participe également à l'amplification de l'expression de *Sox9* (Bullejos et Koopman 2005; Sekido et Lovell-Badge 2008; Knowler et al. 2011).

Le gène *Sox9* est très conservé chez les vertébrés contrairement à son activateur *Sry*, qui est lui spécifique des mammifères.

SOX9 a été découvert dans les années 1990, chez des enfants atteints de dysplasie campomélique* et d'inversion de sexe de type femelle XY. Des mutations hétérozygotes *de novo* du gène *SOX9* ou lors de réarrangements chromosomiques impliquant le locus 17q24 ont

été associées à ce syndrome. Actuellement, ces mutations sur le gène *SOX9* servent de marqueurs prédictifs de diagnostic prénatal pour ce syndrome (Maraia, Saal, et Wangsa 1991; Schafer Alan J. et al. 1995; Kayhan et al. 2019).

Les souris mutantes pour ce gène présentent une inversion de sexe complète (Chaboissier 2004) et *SOX9* est suffisant pour induire la différenciation des cellules de Sertoli, entraînant la formation des testicules lorsqu'il est exprimé chez les souris XX (Vidal et al. 2001).

Contrairement à *SRY* (du moins chez la souris), l'expression de *SOX9* est maintenue dans les cellules Pré-Sertoli pendant toute la vie fœtale et les cellules de Sertoli chez l'adulte grâce à plusieurs boucles d'amplification (Sekido et Lovell-Badge 2008).

Chez la souris, l'expression de *Sry* décroît autour de 12.5 *jpc* (Bullejos et Koopman 2005) et *Sry* ne sera plus jamais exprimé. Ce mécanisme d'extinction de l'expression de *Sry* reste à ce jour obscur. L'étude conduite par (Chaboissier 2004) décrit qu'en l'absence de *Sox9*, l'expression de *Sry* est maintenue, suggérant une boucle de répression de *Sry* activée par *Sox9*. En revanche, cette hypothèse n'est valide que chez les souris puisque chez d'autres espèces étudiées (Homme et Porcins), le gène *SRY* est actif après la naissance des individus XY (Parma, Pailhoux, et Cotinot 1999).

Maintien de l'expression de Sox9

Comme décrit précédemment, l'expression de *Sox9* est maintenue dans les cellules Pré - Sertoli au cours de l'embryogenèse et ensuite à la vie adulte malgré l'arrêt de l'expression de *Sry* à 12.5 *jpc*. Trois boucles de régulation agissent pour maintenir l'expression de *Sox9* et augmenter le nombre de cellules Pré-Sertoli dans le testicule en développement.

Différentes études ont utilisé des gonades chimériques XX XY* pour mettre en lumière les mécanismes moléculaires de la régulation de *Sox9*. Ces gonades se développent généralement sous forme de testicules (S. J. Palmer et Burgoyne 1991b; Wilhelm et al. 2005), indiquant que les cellules Pré-Sertoli sont capables de recruter des cellules somatiques XX voisines et de promouvoir dans ces cellules un destin mâle.

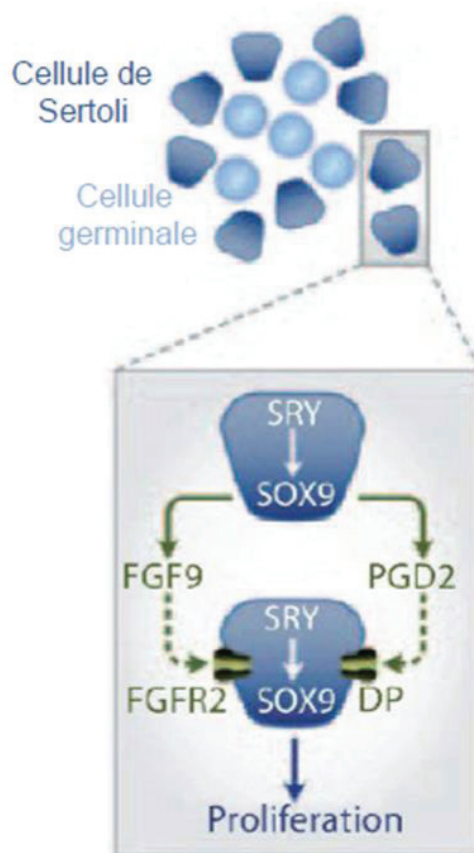
- Un premier mécanisme permettant d'augmenter le nombre de cellules pré-Sertoli exprimant *Sox9* est la prolifération cellulaire. A 11.5 *jpc* les progéniteurs présentent une prolifération cellulaire élevée (Schmahl et al. 2000), qui permet d'amplifier le nombre de

cellules positives pour SOX9 par rapport au nombre de cellules négatives pour SOX9 au pôle postérieur de la crête génitale.

- Le deuxième mécanisme mis en jeu est la voie de signalisation de la prostaglandine D2 (PGD2). La PGD2 se lie à son récepteur Prostaglandin D2 receptor (PTGDR) et active la voie de la signalisation de la protéine kinase A (*Pka*). La PKA induit la translocation nucléaire de SOX9, qui va se lier à son propre promoteur et activer sa propre traduction, créant ainsi une boucle de rétroaction positive (Wilhelm et al. 2005). De plus, par signalisation paracrine, PGD2 induit le transport de SOX9, via la protéine de transport Importin β , dans des cellules qui n'expriment pas *Sry*, permettant leur conversion en cellules exprimant Sox9 (Malki et al. 2005; Moniot et al. 2009).

- Troisièmement, le Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9) et son récepteur Fibroblast Growth Factor receptor 2 (FGFR2) suivent un schéma identique de boucle de rétroaction pour maintenir l'expression de *Sox9*. *Fgf9* est exprimé en aval de *Sox9* et par signalisation paracrine, il permet également l'expression de *Sox9* (Kim et al. 2006) et induit une vague de prolifération des cellules pré-Sertoli. De plus, la suppression de *Fgf9* ou de son récepteur chez la souris provoque respectivement une inversion complète ou partielle du sexe (Colvin et al. 2001; Kim et al. 2007; Bagheri-Fam et al. 2008). Cette voie de signalisation joue donc un rôle essentiel dans la différenciation mâle.

Figure 1.6 : Maintenance de l'expression de Sox9 dans les cellules de Sertoli



Issu de (Ungewitte et Yao 2013)

Toutes ces régulations du maintien de l'expression *Sox9* mettent en lumière l'importance du facteur de transcription *Sox9* en tant que déterminant nécessaire à la différenciation des cellules de Sertoli. Il verrouille l'engagement dans la voie de la différenciation mâle.

A ce stade, les précurseurs des cellules de Sertoli sont bien engagés dans la voie mâle et sont appelés cellules pré-Sertoli. Elles vont alors agir comme un centre organisateur pendant l'organogenèse testiculaire. Les cellules de Sertoli vont influencer la formation des cordons testiculaires et la différenciation et la fonction de plusieurs autres types cellulaires du testicule.

Gènes cibles de *Sox9*

Ainsi le domaine de liaison à l'ADN de la protéine SOX9 est sa force d'activation rapide de ses gènes cibles pour induire la différenciation complète des cellules somatiques du testicule. Les analyses *in vitro* réalisées sur la lignée Mouse Sertoli cell line (MSC1) ont mis en lumière différentes voies de signalisation impliquées dans la différenciation des cellules de Sertoli. De nombreux gènes tels que *Desert Hedgehog (Dhh)* (Clark et al. 2000), *Cytochrome P450, Subfamily XXVIB*, *Polypeptide 1 (Cypb26b1)* (Bowles et al. 2006), *Wnt Inhibitor Factor 1 (Wif1)*, *SRY Box8 (Sox8)*, *Monocyte to Macrophage Differentiation associated protein 2 (Mmd2)* (Li et al. 2014) et *Tyrosine Kinase Type Cell Surface Receptor HER3 (ErbB3)* (Naillat et al. 2014), impliqués dans la différenciation du testicule, sont activés par la liaison de SOX9 à leurs régions régulatrices.

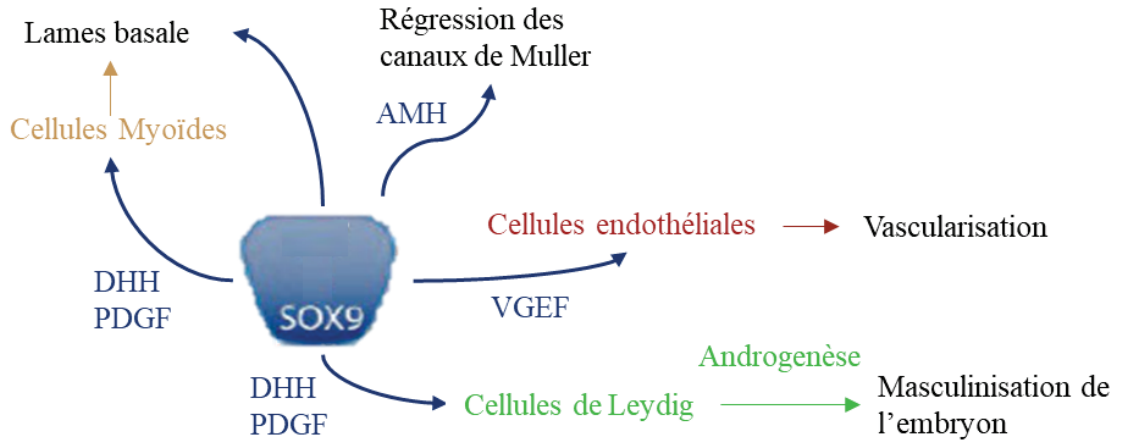
La famille des gènes *Sox* comporte une vingtaine de gènes (Barrionuevo et Scherer 2010) dont *Sox9* et *Sry* qui appartiennent à la sous-famille des gènes *SoxE*, ainsi que les gènes *Sox8* et *Sox10* qui sont exprimés dans les cellules de Sertoli en aval de *Sox9*. Les gènes de la sous-famille *SoxE* possèdent des caractéristiques structurales communes : le domaine de liaison à l'ADN HMG, un domaine de dimérisation conservé en N-terminal et le domaine de trans-activation similaire en C-terminal.

Chez l'homme, l'étude d'un patient mâle 46, XX a permis de mettre en lumière l'implication de *Sox10* dans la différenciation testiculaire (Seeherunvong et al. 2004). Les études chez la souris ont montré que la perte de fonction de ce gène n'entraîne pas d'inversion de sexe de type femelle XY. Mais le gain de fonction de *Sox10* chez des individus XX entraîne une différenciation testiculaire et une inversion de sexe de type mâle XX (Polanco et al. 2010). Ainsi *Sox10*, même s'il est exprimé à plus faible niveau que *Sox9*, est exprimé à 11.5 *jpc* dans les cellules de Sertoli et a un rôle redondant dans la différenciation mâle et le maintien de l'expression de *Sox9*.

Le gène *Sox8* est exprimé à 12.5 *jpc* dans les cellules de Sertoli après l'expression de *Sox9*. L'étude du modèle murin perte de fonction pour ce gène ne montre pas de phénotype dans le développement du testicule embryonnaire (Schepers et al. 2003; Sock et al. 2001). En revanche chez les souris mâles de 5 mois, il est observé un défaut de spermatogenèse et une infertilité (O'Bryan et al. 2008). Ce phénotype avait déjà été observé chez des mutants perte de fonction de *Sox9* tardifs (invalidation conditionnelle de *Sox9* après la détermination du sexe à 14.5 *jpc*) (Barrionuevo et al. 2009). Le gène *Sox8* a un rôle redondant avec *Sox9* dans le maintien de la fonction testiculaire. Ce rôle a été confirmé par l'étude des modèles murins double perte de fonction des deux gènes *Sox8* et *Sox9* (Chaboissier 2004), qui a montré que la délétion des deux gènes entraîne une perte des cordons séminifères après la naissance. Une collaboration entre

SOX8 et SOX9 est nécessaire pour le maintien de la structure du testicule par le maintien de la lame basale des tubes séminifères (Barrionuevo et al. 2009).

Figure 1.7 : Les cellules de Sertoli : centre organisateur de la différenciation testiculaire



Modifié de Ungewitte et Yao, 2012

Différenciation des cellules myoïde périvitubulaires

Chez l'adulte, les cellules myoïdes entourent les tubes séminifères en formant une couche unicellulaire autour de ceux-ci. Elles participent, en collaboration avec les cellules de Sertoli, à la formation de la membrane basale qui entoure les cordons testiculaires et maintient leur intégrité. Leur origine reste à ce jour encore obscure et nous ne connaissons aucun type cellulaire équivalent dans l'ovaire (Capel 1998). Ces cellules ne sont morphologiquement identifiables qu'à partir de 13.5 *jpc* dans le testicule. L'absence de marqueurs spécifiques rend difficile l'étude de ces cellules. Le gène *α -Smooth Muscle Actin* (*α -sma*) a permis d'identifier par traçage cellulaire* l'origine de ces cellules. Le modèle murin *α -Sma-EYFP*, qui exprime le gène rapporteur *eYfp* (enhanced Yellow Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur *α Sma*, a permis de déterminer que les cellules myoïdes et le tissu interstitiel se différencient à partir de cellules somatiques présentes dans le testicule (J. Cool et al. 2008).

Les cellules de Sertoli sécrètent le ligand DHH dont le récepteur Patched1 (PTCH1) est localisé à la membrane des cellules myoïdes, contribuant à leur différenciation et à leur maintien pendant la période embryonnaire et après la naissance (Rebourcet et al. 2014).

Les cellules myoïdes expriment les récepteurs aux androgènes qui les rendent sensibles à la testostérone produite par les cellules stéroïdogènes du testicule (Welsh et al. 2009). Chez l'adulte, elles ont deux rôles primordiaux : la sécrétion du facteur neurotrophique dérivé de la lignée cellulaire gliale (GDNF) qui contribue à l'autorenouvellement des cellules souches spermatogoniales (L.-Y. Chen et al. 2014), et le passage des spermatozoïdes par des mouvements contractiles le long du tube séminifère.

Différenciation des cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont les cellules supportrices de la fonction endocrine du testicule. Elles synthétisent les hormones stéroïdogènes. Plus précisément, les cellules de Leydig expriment plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse dont l'enzyme 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) qui catalyse la synthèse des androgènes qui seront convertis chez le mâle en testostérone et chez la femelle en œstrogènes.

Les hormones stéroïdogènes chez le mâle permettent, avant la naissance, la mise en place des organes génitaux externes avec l'élongation du tubercule génital pour former le pénis et le scrotum. A la puberté, sous l'effet des hormones, les caractères sexuels secondaires se mettent en place, comme le développement de la musculature, la voix grave, la pilosité faciale. Il existe

deux types de cellules de Leydig : les cellules de Leydig fœtales et les cellules de Leydig adultes.

Les cellules de Leydig fœtales

Les cellules de Leydig fœtales sont nécessaires à la masculinisation du système génito-urinaire masculin. Ces cellules régressent ensuite, bien qu'on en retrouve qui persistent au cours de la vie adulte (Kerr et Knell 1988; Shima et al. 2015).

Chez la souris, ces cellules commencent à sécréter des androgènes à 12.5 *jpc* afin de participer à la masculinisation de l'embryon. La testostérone, synthétisée par les cellules de Sertoli, va permettre l'initiation du développement des canaux de Wolff (futurs canaux déférents), le développement des organes génitaux externes, et la descente des testicules (en coopération avec une hormone sécrétée par les cellules de Leydig : l'insuline like 3 (INSL3)).

L'origine des cellules de Leydig serait multiple. Différentes études ont identifié plusieurs progéniteurs présumés pour les cellules de Leydig fœtales, tels que l'épithélium coelomique et les cellules périvasculaires à la frontière gonade– mésonéphros (DeFalco, Takahashi, et Capel 2011; Stévant et al. 2018).

Vers 10.5 *jpc*, les cellules SF1-positives, précurseurs somatiques des cellules de Sertoli et de Leydig, migrent dans la gonade à partir de l'épithélium coelomique. Puis à 11.5 *jpc*, une seconde vague de migration de cellules SF1-négatives provenant du vaisseau coelomique serait la source la plus importante de cellules de Leydig.

Récemment, des progéniteurs WT1-positifs exprimant *Nestin* (membre de la famille des protéines du filament intermédiaire) se différencient en cellules de Leydig fœtales vers 13.5 *jpc* sous le contrôle de la voie de signalisation *Dhh* via NOTCH (Karl et Capel 1998; D. L. Kumar et DeFalco 2018).

Les voies de signalisation *Dhh* et des *Platelet Derived Growth Factor (Pdgf)* sont nécessaires à la différenciation des cellules de Leydig, ainsi qu'à leur maintien. Les ligands de ces deux voies DHH et PDGF- α sont produits par les cellules de Sertoli et vont se fixer à leurs récepteurs localisés sur les progéniteurs des cellules de Leydig (Yao et al. 2002 ; Brennan et al. 2003). Les progéniteurs expriment *Sfl*, *Cyp11a1* et l'enzyme 3 β -HSD qui sont impliqués dans la synthèse des androgènes. Ensuite les cellules différenciées produisent les androgènes et la déhydroépiandrostérone (DHEA) qui sera métabolisée en androsténédione par la 3 β -HSD. L'androsténédione sera ensuite convertie en testostérone par les cellules de Sertoli au cours de la vie fœtale (Barsoum et al. 2013).

Les cellules de Leydig adultes

La deuxième population de cellules de Leydig apparaît au moment de la puberté et acquiert la capacité à produire la testostérone nécessaire au début de la spermatogenèse et au maintien de la fonction de reproduction de l'homme.

Des études chez le rat ont montré que les cellules de Leydig adultes proviennent d'une population de cellules indifférenciées qui ressemblent à des cellules de type mésenchymateuses. Les cellules de Leydig, qui sont morphologiquement distinctes des cellules mésenchymateuses, augmentent en nombre à mesure que le nombre de cellules mésenchymateuses diminue, ce qui suggère que ces cellules peuvent se différencier pour devenir les cellules de Leydig (Hardy, Zirkin, et Ewing 1989). De plus, chez la souris, il a été montré que les deux types de Leydig fœtales et adultes auraient la même origine avec des précurseurs communs spécifiés au cours de l'embryogenèse, qui se différencieraient à des temps différents (Habert, Lejeune, et Saez 2001; Barsoum et al. 2013).

L'inactivation du gène *Pdgf-a* chez la souris a mis en évidence son rôle clef dans la différenciation des cellules de Leydig adultes. En effet, l'inactivation de ce gène entraîne une absence de cellules de Leydig adultes. En revanche les cellules de Leydig fœtales se sont développées chez ces souris (Gnessi et al. 2000).

A la puberté, l'axe hypothalamo-hypophysaire* sensible aux stimuli environnementaux se met en place en sécrétant les hormones gonadotropines (GnRH), la Follicle Stimulating Hormone (FSH) et l'Hormone Lutéinisante (LH). Cet axe est une composante du système nerveux central. Il intervient dans la régulation des grandes fonctions physiologiques via des hormones qui commandent les organes indirectement par le système endocrinien et ses hormones périphériques. Dans le cycle hormonal des gonadotropines, les cellules de Leydig sont les cellules sensibles à la LH sécrétée par l'hypophyse en aval des GnRH. Les cellules de Sertoli, elles, sont sensibles à la FSH et sous son action vont stimuler la spermatogenèse. La LH va stimuler la production de testostérone, qui en retour va exercer un rétrocontrôle négatif de la production des GnRH afin de conserver un taux régulé.

En résumé, chez la souris, les cellules de Leydig fœtales vont permettre la synthèse de testostérone par les cellules de Sertoli. Cette testostérone est nécessaire à l'acquisition des caractères primaires mâles de l'embryon. Aux alentours de la naissance, le nombre de cellules de Leydig fœtales diminue ainsi que le taux de testostérone, permettant la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophysaire. A la puberté, elles sont majoritairement remplacées par les cellules de Leydig adultes, mais une petite partie de la population persiste. Les cellules de Leydig adultes ayant la capacité de produire de la testostérone, le taux de

l'hormone augmente, permettant ainsi la mise en place de la spermatogenèse tout au long de la vie.

Organisation du testicule : vascularisation et formation des cordons testiculaires.

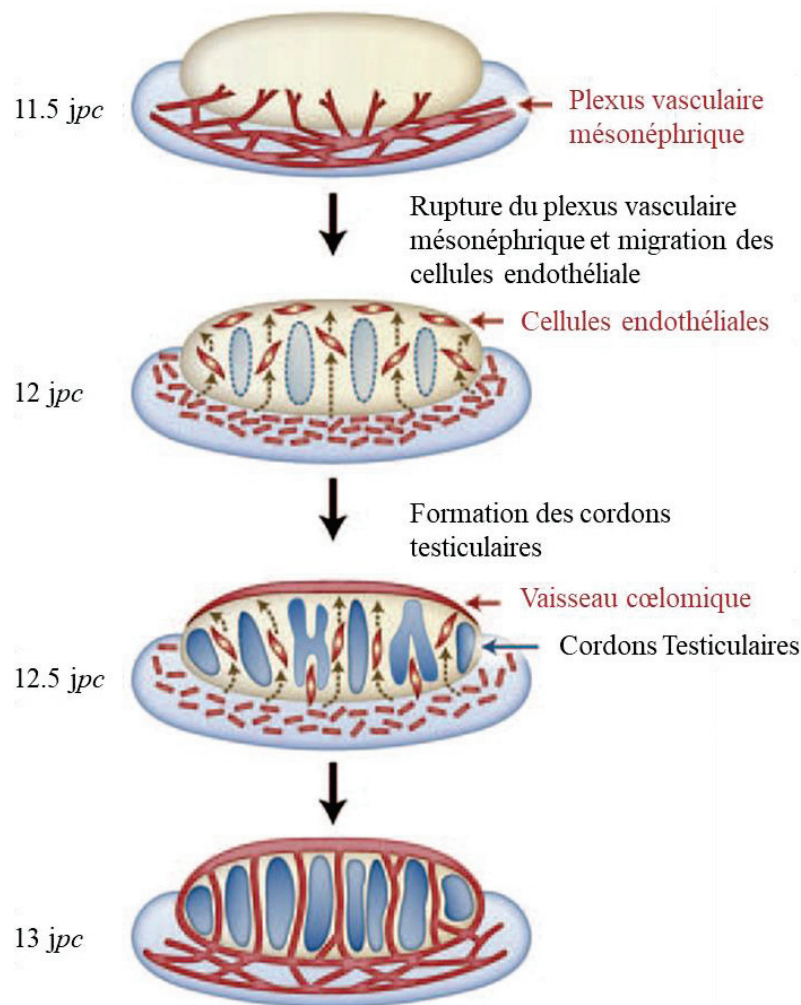
Au cours de la formation des gonades, les différences morphologiques entre l'ovaire et le testicule se creusent à partir de 12.5 *jpc*. En effet, on observe chez les individus XY la formation des cordons testiculaires* et l'apparition du vaisseau cœlomique. Les cordons testiculaires sont les futurs tubes séminifères. Avant la naissance, ils sont pleins et ils sont composés par l'association des cellules de Sertoli et des cellules myoïdes, englobant les cellules germinales. Les cordons sont entourés par une membrane basale qui est synthétisée par les cellules myoïdes péritubulaires. A la puberté, les cordons testiculaires vont se creuser en leur centre pour laisser une lumière qui permettra le relargage des spermatozoïdes. Les cordons vont se différencier en tubes séminifères, sites de production de la spermatogenèse. Entre les cordons, le tissu interstitiel est le siège des cellules de Leydig et de la vascularisation des testicules.

La mise en place des réseaux vasculaires permet l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules contenues dans la gonade. Ces réseaux jouent également un rôle instructif dans la structuration de l'organe. Ils conditionnent la manière dont le testicule se développe pour obtenir sa structure finale et être fonctionnel chez l'adulte (DeFalco et al. 2014).

Chez la souris, les cordons testiculaires ne peuvent se développer sans la vascularisation du testicule (Jonah Cool, DeFalco, et Capel 2011). Les cellules de Sertoli vont initier la vascularisation de la gonade. Entre 11.5 *jpc*, et 12.5 *jpc*, les cellules pré-Sertoli, alors mésenchymateuses (Coveney et al. 2008), sécrètent le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) qui va induire la migration de cellules endothéliales dans la gonade. L'expression de VEGF induit la rupture du plexus vasculaire mésonéphrique, qui libère des cellules endothéliales individuelles (Merchant-Larios, Moreno-Mendoza, et Buehr 1993; Coveney et al. 2008). Les cellules endothéliales migrent et envahissent la gonade en direction de l'épithélium cœlomique afin de former le vaisseau cœlomique primitif. Dans un modèle d'inhibition pharmacologique du VEGF, l'angiogenèse du testicule est complètement bloquée (Jonah Cool, DeFalco, et Capel 2011). Bien que les cellules de Sertoli exprimant AMH/SOX9 aient été spécifiées en l'absence de système vasculaire, elles ne sont pas organisées en cordons testiculaires.

A 12.5 *jpc*, en parallèle, les cellules pré-Sertoli se regroupent en clusters autour des cellules germinales (Combes et al. 2009), initiant la formation des cordons testiculaires. La différenciation des cellules myoïdes péritubulaires va permettre la sécrétion de la lame basale en coopération avec les cellules pré-Sertoli (Skinner, Tung, et Fritz 1985). La lame basale entoure les cordons, les séparant du tissu interstitiel.

Figure 1.8 : Modèle de vascularisation du testicule



Modifié de (Ungewitte et Yao 2013).

Lors de cette phase d'important remodelage vasculaire dans la gonade, les macrophages sont impliqués dans la clairance* des cellules germinales et Sertoli isolées qui ne se regroupent pas en clusters. En effet, dans les testicules ayant subi une ablation des macrophages, des amas de cellules de Sertoli se localisent couramment en dehors des cordons testiculaires (DeFalco et al. 2014). Les macrophages fœtaux proviennent du sac vitellin et ils sécrètent également du VEGF α . La localisation locale du VEGF α influence le trajet de

migration des cellules endothéliales en direction du vaisseau cœlomique autour des clusters de cellules de Sertoli (Nucera, Bizziato, et Palma 2011; DeFalco et al. 2014).

A partir de 13.5 *jpc*, les cellules pré-Sertoli deviennent de type épithélial avec le noyau des cellules localisé près de la lame basale, on les appelle alors cellules de Sertoli (Nel-Themaat et al. 2011), formant l'épithélium séminifère. Au même moment, les micro-vaisseaux sont bien organisés afin de former le vaisseau cœlomique. A partir du vaisseau cœlomique, de nouveaux capillaires se forment sous l'expression du gène *Eph-Related Receptor Tyrosine Kinase (EphrinB2)*, *Platelet Endothelia Cell Adhesion Molecule A (Pecam1)* et *Notch1*. Les nouveaux capillaires forment le réseau veineux à partir du vaisseau cœlomique jusqu'au mésonéphros entourant les cordons testiculaires (Brennan, Karl, et Capel 2002; Buehr, Gu, et McLaren 1993). Enfin, entre 13.5 *jpc* et 14.5 *jpc*, les réseaux veineux sont en place autour des cordons, donnant au testicule sa morphologie.

Différenciation ovarienne

Dans les années 1950, l'endocrinologue français Alfred Jost mena des expériences de castration *in utero* de fœtus de lapin. Il observa chez les lapereaux castrés, après leur naissance, quel que soit leur sexe, que leurs organes génitaux externes se développaient suivant un déterminisme femelle. Ces expériences, bien que basées uniquement sur l'observation de la morphologie externe des lapereaux et non sur l'analyse histologique de leur développement gonadique, initièrent l'établissement du dogme selon lequel en l'absence du chromosome Y, la gonade bipotentielle se différencie « par défaut » en ovaire.

Cela ne voulait pas dire que la voie ovarienne est une voie "passive", mais que la gonade semblait être entraînée vers un destin de type mâle par la présence du chromosome Y, tandis que son état par défaut entraînait le développement d'un ovaire. Ainsi les études se sont focalisées sur les mécanismes de la différenciation mâle tandis que l'étude du développement ovarien a accusé près de 20 ans de retard.

Un gène porté par le chromosome X a longtemps été proposé comme pouvant être l'homologue femelle de *Sry*. Des mutations (duplication) du gène *Dosage sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X (Dax1)* sont à l'origine d'inversions de sexe complètes chez des patients femelles 46,XY (Swain et al. 1998; Sanlaville et al. 2004). *Dax1* est exprimé précocement dans les précurseurs somatiques et sa localisation sur le chromosome X faisait de lui le candidat idéal. Cependant, une première étude a montré qu'il n'était pas nécessaire au développement de l'ovaire (Yu et al. 1998) car les souris *Dax1* perte de fonction présentent des ovaires normaux. Et il a été finalement montré que *Dax1* était un antagoniste de la voie mâle en diminuant l'expression de *Sox9* (Swain et al. 1998; Ludbrook et al. 2012).

L'étude de patients DSD mâles 46,XX, chez qui on a observé des anomalies du déterminisme du sexe en l'absence des gènes *SRY* ou *SOX9*, a pu mettre en lumière l'existence de facteurs ovariens (Vainio et al. 1999; Parma et al. 2006). Aujourd'hui, il est admis qu'il existe des facteurs ovariens nécessaires au développement de l'ovaire et que l'orientation de la gonade vers un destin femelle ou mâle résulte d'un antagonisme entre les deux voies. Ainsi, le gène *Wnt4* a été impliqué dans des désordres du développement sexuel de type mâle XX. En effet, il a été observé chez différents patients humains qu'une trop grande activité de *WNT4* (duplication) induisait une inversion de sexe de type femelle 46,XY, tandis que trop peu d'activité de *WNT4* (mutation avec perte de fonction homozygote) induisait une inversion de sexe de type mâle 46, XX.

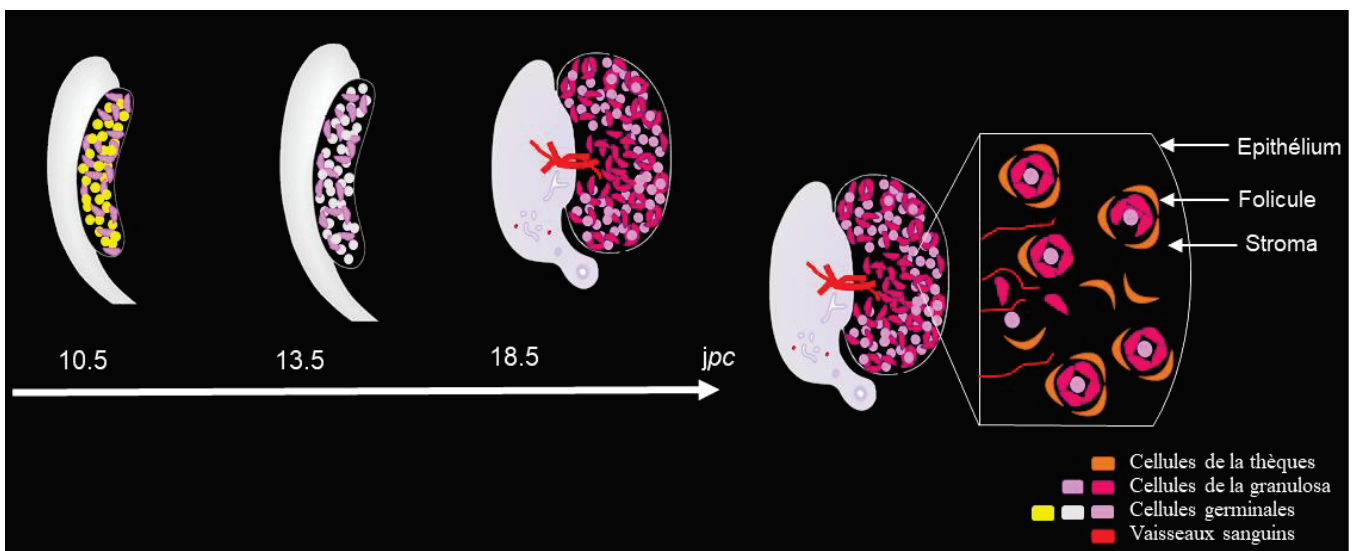
Plus récemment, des mutations dans le gène *R-SPONDINI* ont été caractérisées dans un syndrome mêlant pathologies cutanées comme l'hyperkératose palmoplantaire* et prédisposition aux carcinomes des cellules squameuses* (peau, oesophage). Ces patients présentaient également une inversion de sexe de type mâle 46 XX, SRY- négatif (Parma et al. 2006).

De plus, en 2008, une mutation homozygote de *R-SPONDINI* a été identifiée chez un patient atteint d'hermaphrodisme syndromique (Tomaselli et al. 2008).

On sait aujourd'hui que la voie ovarienne est déjà établie à 12.5 *jpc* (Tilmann et Capel 1999, McLaren & Adams 2002). Dans l'embryon XX, les cellules somatiques ne subissent pas de changements histologiques aussi visibles que dans les cellules somatiques mâles, la prolifération des précurseurs somatiques est réduite par rapport à la gonade mâle, et la seule évidence d'une différenciation sexuelle était observée au niveau de la condensation des chromosomes des cellules germinales à la suite de l'entrée en méiose à 13.5 *jpc*.

L'étude de la différenciation ovarienne a été pendant longtemps - et est encore aujourd'hui - limitée car il n'existe que très peu de marqueurs moléculaires spécifiques pour étudier les différents types cellulaires de l'ovaire en développement. Les séquençages du transcriptome en single-cell réalisés tout récemment vont désormais permettre d'avancer dans l'étude du développement ovarien (Stevant, 2019).

Figure 1.9 : Modèle de la différenciation de l'ovaire



Inspiré de (Svingen et Koopman 2013)

On peut relever trois évènements majeurs au cours de la différenciation ovarienne :

- 1) la spécification des cellules de la granulosa,
- 2) la différenciation des cellules de la thèque,
- 3) la folliculogénèse.

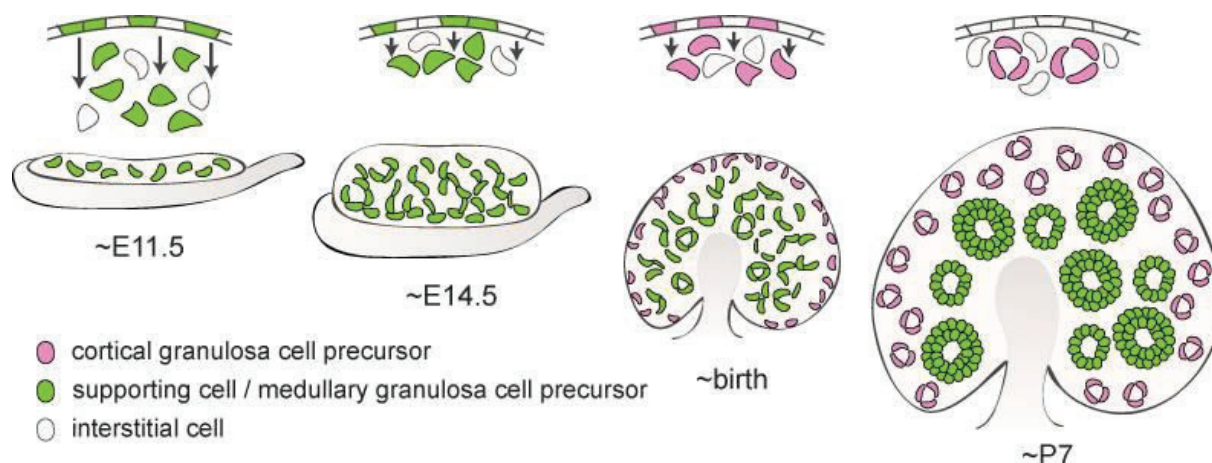
Origine et spécification des cellules de la granulosa

Les cellules de la granulosa sont les homologues femelles des cellules de Sertoli. Elles sont les cellules de soutien et cellules nourricières des cellules germinales. Elles participent à l'élaboration, la croissance et le développement des follicules ovariens contenant les ovocytes. Elles sont spécifiées dès 12.5 *jpc* comme leurs homologues mâles. Différentes études ont montré que les cellules de la granulosa ont deux origines différentes : les précurseurs somatiques qui se délaminent de l'épithélium cœlomique (communs aux cellules de Sertoli) et des progéniteurs provenant du *rete ovarii*, bordure entre le mésonephros et la gonade (Chang Liu et al. 2015).

La première population issue de l'épithélium cœlomique a été identifiée lors d'une étude de traçage cellulaire de *Sry* (modèle murin exprimant la eGFP sous un promoteur partiel (transgène) de *Sry* : *Sry-eGFP*). Chez les souris XX, entre 12.5 et 13.5 *jpc*, ce modèle a permis de mettre en évidence que des cellules de la pré-granulosa expriment la eGFP, indiquant une origine commune avec les cellules de Sertoli : ces cellules possèdent la machinerie transcriptionnelle capable d'activer le promoteur de *Sry* dans les gonades XX (Albrecht et Eicher 2001). Ainsi les expériences de traçage cellulaire ont montré que les cellules de granulosa provenant de l'épithélium cœlomique migrent dans la gonade XX et se développent à partir d'un précurseur commun aux cellules de Sertoli.

Bien que les précurseurs somatiques prolifèrent moins dans la gonade XX, c'est cette entrée des précurseurs de l'épithélium cœlomique dans la gonade qui contribue en majorité à former le stock des cellules de la granulosa. Elle est continue à partir de 11.5 *jpc* jusqu'à 16.5 *jpc*.

Figure 1.10 : Origine des cellules de la granulosa



Première vague de migration des cellules de la pré-granulosa (en vert) à 11.5 *jpc*. Ces cellules de la pré-granulosa donneront naissance à la première vague de la folliculogenèse après leur assemblage à la naissance. La deuxième vague (en rose) de migration de cellules de la pré-granulosa commence à partir de 14.5 *jpc*. Ces cellules donneront naissance aux follicules activés à l'âge adulte. Issu de (Mork et al. 2012).

A 12.5 *jpc*, les progéniteurs somatiques expriment le facteur de transcription *Forkhead box L2 (Foxl2)*. *Foxl2* est spécifique des cellules de la pré-granulosa qui contribueront à la formation des follicules primordiaux médullaires qui sont actifs de la naissance à la puberté (Mork et al. 2012). Le facteur *Foxl2* a été identifié comme un gène déterminant dans le développement ovarien, « homologue de *Sry* ». En effet chez la chèvre, un phénotype d'inversion de sexe de type mâle XX est associé à la perte de fonction de *Foxl2* (Pailhoux et al. 2001; Boulanger et al. 2014). Cependant, chez l'Homme, la perte de fonction homozygote de *FOXL2* n'a jamais été décrite car vraisemblablement létale. Cependant, des patients porteurs de mutations hétérozygotes présentent d'autres pathologies liées ou non au sexe (Blépharophimose-ptose-épicanthus* ; Insuffisance ovarienne prématurée) (Crisponi et al. 2001). Il en est de même chez la souris où *Foxl2* n'est pas suffisant à la formation de l'ovaire. La perte de fonction homozygote de *Foxl2* chez la souris est associée à une insuffisance ovarienne précoce et à l'absence de maturation des follicules primordiaux en follicules primaires (Uda et al. 2004; Garcia-Ortiz et al. 2009; Schmidt et al. 2004).

Le phénotype le plus remarquable chez la souris est observé lors de l'inactivation conditionnelle de *Foxl2* dans l'ovaire adulte. Les cellules de la granulosa, bien établies dans les follicules, vont perdre leur identité en l'absence de *Foxl2* (modèle murin *RS26CreERT2 :Foxl2^{ff}*) et vont se transdifférencier en cellules de type Sertoli qui expriment *Sox9* (Ottolenghi et al. 2005; Uhlenhaut et al. 2009).

Ces derniers résultats prouvent que *Foxl2* n'est pas le facteur déterminant du sexe femelle chez la souris, mais qu'il est impliqué dans le maintien des cellules de la pré-granulosa et la formation des follicules chez l'Homme et la souris.

Une deuxième population provenant de l'épithélium coelomique a été identifiée dans l'ovaire embryonnaire. Ainsi, l'étude du mutant *Sry-eGFP* a permis également de détecter des cellules qui expriment FOXL2 mais ne sont pas positives pour la eGFP (Albrecht et Eicher 2001). Il s'agit d'une autre population de cellules pré-granulosa qui n'ont pas la même origine que les précurseurs somatiques de type Sertoli. Cette deuxième population migre à partir de l'épithélium coelomique dans la gonade aux alentours de 14.5 – 16.5 *jpc*.

Jusqu'à récemment, aucun marqueur n'avait été identifié pour cette deuxième population de cellules pré-granulosa. Ce pool de cellules réside dans la région corticale de l'ovaire embryonnaire et participera à la formation des follicules actifs tout au long de la vie adulte (Mork et al. 2012; Zheng et al. 2014). Cette population exprime le gène *Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5 (Lgr5)*, un récepteur de la voie de signalisation WNT/ β -catenin (Rastetter et al. 2014). Il est donc été émise l'hypothèse que cette deuxième population est régulée par la voie de signalisation WNT/ β -catenin. En effet, plusieurs études ont montré que la perte de fonction de *Foxl2* associée à la perte de fonction de la voie WNT/ β -catenin favorise le phénotype d'inversion de sexe de type mâle XX (Auguste et al. 2011; Ottolenghi et al. 2007).

Le gène *Wnt4* est exprimé lors de la formation de la crête génitale XX et XY et ce n'est que vers 11.5 *jpc* que l'expression de ce gène devient spécifique à l'embryon XX. La protéine WNT4, comme la protéine RSPO1, sont des ligands activateurs de la voie WNT/ β -catenin. Le ligand WNT4 va se lier à son récepteur Frizzled et LRP5/6 afin de permettre l'accumulation de β -catenin dans le cytoplasme avant qu'elle ne soit transloquée dans le noyau pour induire l'expression de ses gènes cibles. Cette voie de signalisation est régulée par différentes molécules dont les Ubiquitines ligases E3 (RNF43 et ZNRF3) (Hao et al. 2012; Koo et al. 2012). Ces deux récepteurs cytoplasmiques agissent comme répresseurs en entraînant l'endocytose des corécepteurs Frizzled et LRP5/6 (W. de Lau et al. 2014).

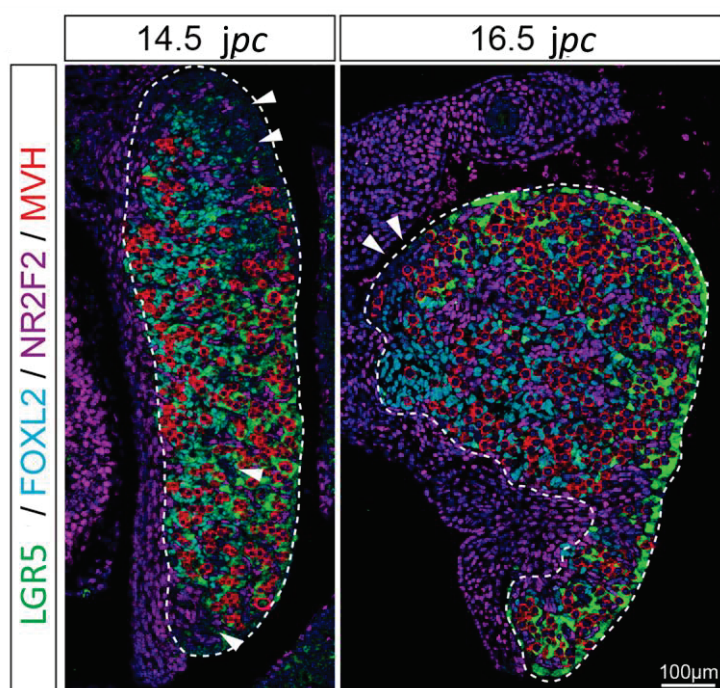
RSPO1 permet de maintenir l'activation de la voie WNT/ β -catenin : en se liant à son récepteur LRG4, LGR5 ou LGR6, il peut recruter RNF43/ZNRF3 et promouvoir leur dégradation après par endocytose.

Chez la souris, l'invalidation du gène *Rspo1* a pour conséquence l'inhibition de la voie canonique WNT/ β -catenin. A 12.5 *jpc*, un vaisseau coelomique se forme à la surface de la gonade mutante, les cellules de la pré-granulosa cessent de proliférer et, vers 17.5 *jpc*, elles vont exprimer des marqueurs mâles comme *Sox9*, les cellules somatiques vont d'organiser en

structures de type cordons testiculaires (anormaux), aboutissant à la formation d'un ovo-testicule (Chassot et al. 2008a,b).

L'inactivation de *Wnt4* chez la souris XX présente un phénotype similaire à celui du mutant XX délété pour *Rspo1*. Ces mutants présentent des signes de transdifférenciation de cellules pré-granulosa en cellules de Sertoli aux alentours de la naissance, à la suite d'un déclin sévère du nombre de cellules germinales (Maatouk et al. 2013). Les rôles dans la détermination du sexe de *Wnt4* et *Rspo1* seront détaillés dans le « Chapitre 4 : La voie WNT/ β -catenin est activée dans l'ovaire en développement ».

Figure 1.11 : Trois types de cellules somatiques dans l'ovaire de souris fœtal



A 14,5 jpc chaque type de cellules somatiques est identifié par l'expression de LGR5 (en vert), Foxl2 (en bleu) ou NR2f2 (en violet). Les cellules germinales sont identifiées par l'expression de MVH (en rouge). Cependant il existe encore une sub-population proche de l'épithélium coelomique n'exprimant aucun de ces marqueurs (flèches blanches). A 16,5 jpc, ces cellules triples négatives ont diminué. Les ovaires sont délimités par des lignes pointillées.

Issu de (Rastetter et al. 2014)

Ultérieurement, l'étude des mutants *Wnt4* a mis en évidence le rôle d'un gène cible de *Wnt4*, *Follistatine* (*Fst*) dans la voie moléculaire régissant la différenciation des cellules de la pré-granulosa. *Fst* module l'activité des activines et inhibines de la voie des *Tgfb*. Les souris transgéniques déficientes dans l'expression de *Fst* présentent une inversion de sexe précoce et partielle de type ovo-testicule (mâle XX). La FST inhibe l'activine B, ce qui a pour conséquence l'inhibition de la formation du vaisseau coelomique (H. H. C. Yao et al. 2004). Plus récemment, *Foxl2* a été identifié comme un régulateur de l'expression de *Fst* (Kashimada et al. 2011). A 11,5 jpc, l'expression de *Fst* est initiée par *Wnt4* et, plus tardivement, *Foxl2* (15,5 jpc) permet le maintien de l'expression de *Fst* en coopération avec le facteur *Bone Morphogenetic protein 2* (*Bmp2*) (activateur de la voie des TGF β). A ce jour, les voies

moléculaires impliquées dans le mécanisme d'action de la FST restent obscures mais le gène *Fst* est nécessaire à la différenciation des cellules de la pré-granulosa et à la formation des follicules primordiaux.

Enfin, une niche de cellules précurseurs somatiques a été identifiée au niveau de la bordure entre le mésonéphros et l'ovaire que l'on appelle le *rete ovarii* (Auguste et al. 2011)). Différentes études apportent l'hypothèse qu'il existe des cellules progénitrices du soma ovarien. Cependant par manque de marqueur spécifique pour approfondir cette étude, le rôle de ces progéniteurs reste encore obscur. En effet, chez les souris mutantes perte de fonction de *Rspo1*, il est observé que FOXL2 n'est plus localisé du côté de l'épithélium coelomique mais maintenu dans la seconde moitié proche du *rete ovarii* (Auguste et al. 2011). Cette population est indépendante de la voie de signalisation RSPO1/WNT/ β -catenin.

Différenciation des cellules de la thèque

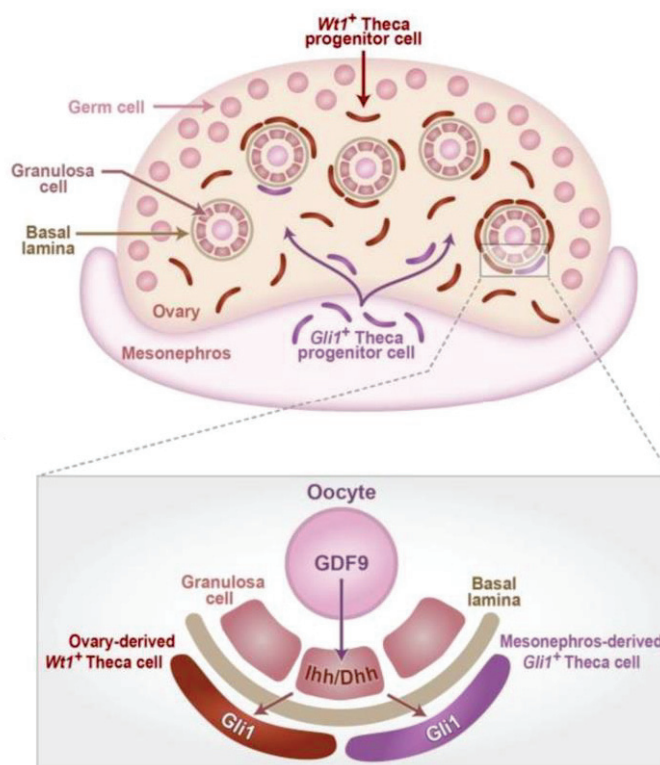
Bien que les sources des cellules de l'épithélium et de la granulosa de l'ovaire soient connues, les origines des cellules progénitrices de la thèque n'ont pas été identifiées de manière définitive (Chang Liu et al. 2015). A l'âge adulte, les cellules de la thèque ou cellules stéroïdogènes sont responsables de la synthèse des androgènes qui seront ensuite convertis en œstrogènes par l'aromatase dans les cellules de la granulosa (Edson et al, 2009). Ces cellules ne peuvent être distinguées morphologiquement qu'après la naissance dans les follicules secondaires. Cependant, elles seraient spécifiées au cours de l'embryogenèse en cellules progénitrices spécifiques (Edson et al, 2009). L'origine des précurseurs des cellules de la thèque reste encore peu connue, mais la localisation des cellules une fois différenciées a permis d'établir une théorie largement acceptée. Les cellules de la thèque différenciées sont localisées dans le mésenchyme ovarien et séparées des follicules par une membrane basale. Ces cellules auraient pour origine un précurseur commun bipotentiel à activité stéroïdogène (cellules de la thèque et cellules de Leydig). Il est donc supposé que les cellules de la thèque sont recrutées par des signaux sécrétés provenant des cellules de la granulosa (Liu et Yao 2010; Young et McNeilly 2010). La voie de signalisation Hedgehog semble être impliquée dans la différenciation des cellules de la thèque. Les ligands activateurs de la voie *Indian Hedgehog* (*IHH*) et *DHH* sont exprimés et sécrétés par les cellules de la granulosa. Ils se fixent au récepteur PTCH1, qui est exprimé à la membrane des cellules de la thèque, induisant l'expression du facteur de transcription *GLI family zinc finger 1* (*Gli1*) (Wijgerde et al. 2005). L'expression de *Gli1* commence à apparaître dans le mésenchyme de l'ovaire néonatal. On soupçonne ces cellules comme étant un pool de progéniteurs pour les cellules de la thèque adulte.

A 12.5 *jpc*, l'expression de *Gli1* n'est présente que dans le mésonéphros qui constituerait la source de ces progéniteurs. Les cellules positives pour GLI1 sont retrouvées dans l'ovaire après 16.5 *jpc* et expriment l'enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β HSD) qui participe à la synthèse des androgènes. L'étude des mutants perte de fonction de *Ihh* et *Dhh* a permis de valider ces hypothèses. En l'absence de *Ihh* et *Dhh*, les cellules progénitrices de la thèque ne parviennent pas à se différencier en cellules productrices d'androgènes et la folliculogénèse ovarienne est bloquée au stade pré-antral avec deux ou trois couches de cellules de la granulosa (Wijgerde et al. 2005).

Il semble cependant que l'épithélium cœlomique soit la source principale des progéniteurs stéroïdogènes. En effet, un traçage cellulaire de *Wt1*, grâce à un modèle murin d'expression de la EGFP sous le promoteur *Wt1*, a pu mettre en évidence des cellules positives pour la EGFP localisées dans le mésenchyme de l'ovaire. Un mois après la naissance, les cellules WT1-positives expriment le marqueur 3 β HSD et GLI1, indiquant qu'elles se sont engagées dans la lignée cellulaire des cellules de la thèque (Chang Liu et al. 2015).

Cependant, l'analyse du transcriptome des deux populations de la thèque a indiqué que les cellules thécales dérivées du mésonéphros présentent un transcriptome différent de celui de la population *Gli1*-positive dérivée des ovaires (WT1-positives). Les deux populations expriment toutes deux les marqueurs de la stéroïdogénèse (3 β HSD) nécessaires à la production d'androgènes dans l'ovaire. Mais la population *Gli1*-positive dérivée des ovaires (WT1-positives) aurait également un rôle de soutien de la couche de cellules de la thèque car elle exprime des gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire ainsi que les récepteurs aux œstrogènes (*Esr1*). La population *Gli1*-positive dérivée du mésonéphros exprime des gènes comme *Steroidogenic Acute Regulatory Protein (Star)*, *Cyp17a1* et *Lutropin-Choriogonadotropic Hormone Receptor (Lhcgr)* qui contribuent à l'activité stéroïdogène de ces cellules (Chang Liu et al. 2015).

Figure 1.12 : Origine et voies moléculaires des cellules de la thèque



Issu de (Chang Liu et al. 2015).

La voie *Hedgehog* ne serait pas la seule voie nécessaire dans la différenciation des cellules de la thèque. En effet, la production des ligands *Hedgehog* dans les cellules de la granulosa est régulée par le facteur *Growth differentiation factor 9* (*Gdf9*), sécrété spécifiquement par l'ovocyte lors de la formation des follicules primaires juste après la naissance (Dong et al. 1996). En effet, chez la souris déficiente pour ce gène, on observe un arrêt de la croissance folliculaire et une absence de recrutement des cellules de la thèque (Vitt et al. 2000; Dong et al. 1996; Carabatsos et al. 1998).

D'autres facteurs, tels que la voie *Kit/KitL* (Facteur Stem Cell (SCF)) sont impliqués dans ce dialogue paracrine entre les cellules de la thèque, les cellules de la granulosa et les ovocytes. Les cellules de la granulosa sécrètent le ligand KIT qui va se lier à son récepteur KIT présent à la surface des ovocytes et des cellules de la thèque. La voie Kit est décrite *in vitro* comme étant nécessaire à la prolifération des cellules de la thèque (Driancourt et al. 2000; Parrott et Skinner 2000).

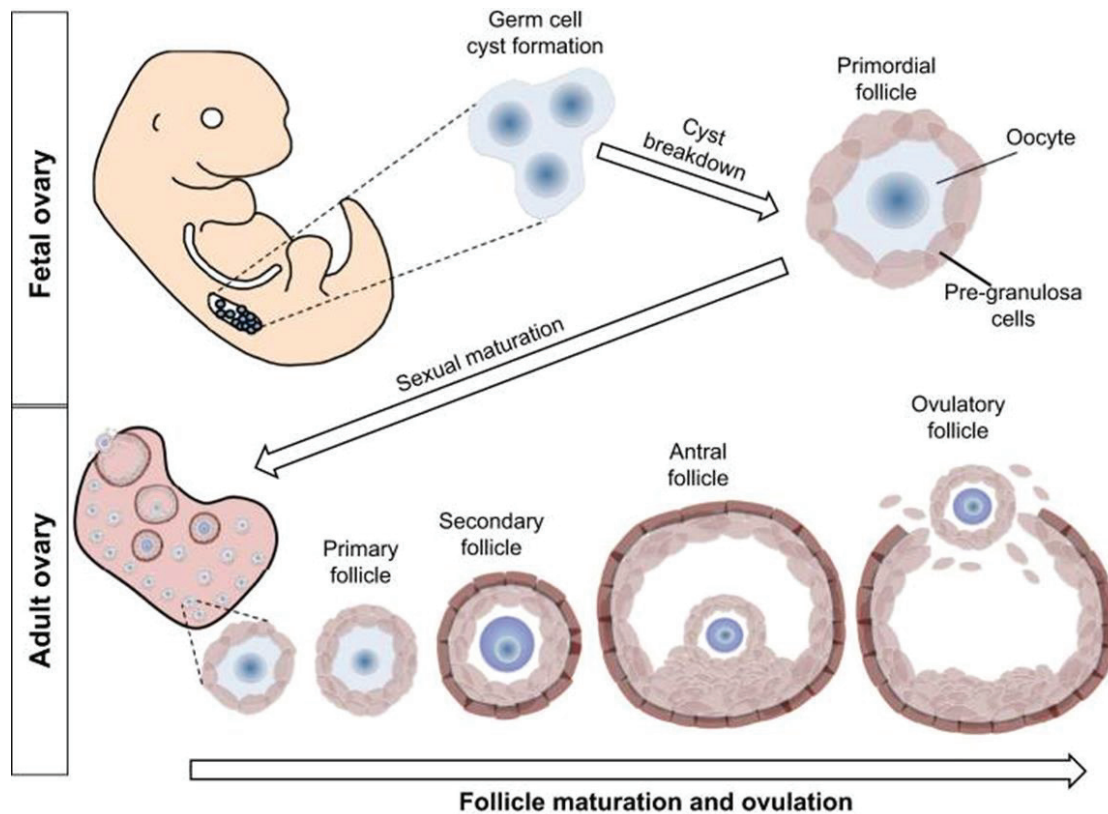
Les cellules de la thèque dans l'ovaire adulte vont se regrouper en deux sous-populations entourant le follicule à partir du stade secondaire :

- La thèque interne, juste après la couche de cellules de la granulosa, est une couche très vascularisée et formée par les cellules qui contribuent à la production des hormones stéroïdes ;
- La thèque externe est une couche formée de cellules stromales qui forment la transition avec le stroma de l'ovaire.

La folliculogénèse

L'ovaire assure deux fonctions clés : la génération d'ovocytes matures, fertilisables, et la sécrétion d'hormones stéroïdiennes nécessaires à la grossesse et à l'homéostasie de l'ovaire adulte. Les follicules sont les unités fonctionnelles de l'ovaire. Chaque follicule est composé d'un ovocyte en cours de développement, de plusieurs couches de cellules de la granulosa, d'une membrane basale et des cellules de la thèque. Ces follicules vont progresser au travers des différents stades de développement permettant la réalisation de leur potentiel stéroïdogène et ovulatoire grâce à une communication bidirectionnelle entre les cellules de la granulosa et les ovocytes, et entre les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque (Eppig 2018).

Figure 1.13 : Folliculogénèse du stade foetal à l'âge adulte



Issu de (Grive et Freiman 2015).

Le premier stade de développement des follicules est le stade primordial. Suivant les espèces, ce stade est établi dans l'ovaire fœtal ou néonatal (chez la souris, 1-2 jours après la naissance). L'ovaire est doté de plusieurs millions de ces follicules primordiaux constitués d'un ovocyte et entourés d'une seule couche de cellules aplaties de la pré-granulosa.

A ce stade, les ovocytes sont regroupés sous forme de nids ovigères liés entre eux par des ponts intercellulaires résultant d'une division cellulaire avec une cytokinèse incomplète (le développement et la différenciation des cellules germinales seront décrits dans le chapitre II « Origine et mise en place de la lignée germinale »).

La première étape de formation des follicules primordiaux consiste à la rupture des nids d'ovocytes pour permettre le dépôt des cellules pré-granulosa sur les ovocytes qui ont survécu à la rupture induite (Pepling et Spradling 2001). La rupture des nids ovigères se fait juste avant la naissance chez la souris et nécessite une régulation fine de mécanismes d'apoptose et de survie afin d'individualiser les ovocytes. Ensuite, les ovocytes individualisés vont exprimer un facteur de transcription, *Factor In the GermLine a (Figla)*, qui est nécessaire au recrutement des cellules de la pré-granulosa autour de l'ovocyte. Les individus XX du modèle murin invalidé pour le gène *Figla* sont stériles car ils ne possèdent pas de follicules. Alors qu'avant la naissance, ces mutants présentent le même nombre de cellules germinales que les animaux contrôles, les follicules primordiaux ne se forment pas après la naissance (Soyal, Amleh, et Dean 2000).

Les follicules primordiaux ont deux origines bien distinctes qui influencent également leurs rôles. En effet la première population de cellules de la pré-granulosa, marquée par l'expression de *Foxl2*, provenant de l'épithélium cœlomique, va former les follicules dans la médulla (Mork et al. 2012). De la naissance à la puberté, ces follicules sont activés et contribuent au début de la puberté et à la fertilité précoce. On les appelle follicules de la première vague (Zheng et al. 2014).

La deuxième population, exprimant LGR5, est nécessaire à la formation d'un autre pool de follicules primordiaux. Ces follicules sont localisés dans le cortex de l'ovaire en développement. Ces follicules serviront de pool définitif de follicules primordiaux pour toute la durée de vie reproductive de l'organisme, et sont appelés follicules de deuxième vague (Mork et al. 2012).

La formation des follicules primordiaux (première et deuxième vagues) résulte d'un étroit dialogue entre les cellules germinales et les cellules de la pré-granulosa. En absence des cellules germinales, les follicules primordiaux ne se forment pas et les cellules de la

granulosa se transdifférencient en cellules exprimant SOX9 (Hashimoto et al. 1990; McLaren et Buehr 1990; Taketo et al. 1993; H. H. C. Yao et al. 2004). Inversement, si les cellules somatiques ne se différencient pas, les cellules germinales entrent en apoptose (Uhlenhaut et al. 2009).

Avant la puberté, les follicules primordiaux de la première vague vont se différencier en follicules primaires et secondaires. Cette étape de différenciation des follicules se fait indépendamment des hormones responsables de l'ovulation, les gonadotropines; ce sont les follicules pré-antraux.

Les différences majeures entre les follicules primordiaux et pré-antraux sont la morphologie et le nombre de couches de cellules de la granulosa. Alors qu'au stade primordial, les cellules de la granulosa présentent une morphologie aplatie et quiescente de type mésenchymateuse, elles vont devenir des cellules matures cuboïdes avec une polarisation basale/apicale de type épithélial. Les cellules de la granulosa restent en contact avec l'ovocyte via des processus transzonaux (TZP). Les TZP sont des filopodes qui vont créer le contact avec l'ovocyte (Eppig 2018). Le trafic physiologique à travers les TZP comprend des métabolites et des molécules de signalisation et pourrait être la clé de la communication paracrine entre les deux types cellulaires. Les follicules primaires présentent une seule couche de cellules de granulosa et ils commencent à sécréter les signaux *Kit/Ihh/Dhh* (comme décrit plus tôt) pour recruter les cellules de la thèque. Au stade secondaire, on observe deux couches de cellules de la granulosa cuboïde et les cellules de la thèque entourent les follicules séparés par la lame basale.

Le gène *Foxl2* joue un rôle important dans la maturation des follicules primordiaux en primaires. Chez les mutants souris perte de fonction homozygote pour *Foxl2*, aucun follicule primaire n'est observé et la folliculogénèse est bloquée (Schmidt et al. 2004). Un autre gène a été décrit comme nécessaire à cette transition, le gène *Newborn oogenesis homeobox (Nobox)*. *Nobox* agit en partenariat avec *Foxl2* durant la folliculogénèse. Chez les souris déficientes pour *Nobox*, il est observé une perte des ovocytes accélérée et post-natale ainsi qu'une absence de transition des follicules primordiaux à ceux en croissance. Les souris sont donc stériles. NOBOX, sécrété par les ovocytes, permet le maintien de l'expression de *Foxl2* (Rajkovic et al. 2004; Bouilly, Veitia, et Binart 2014).

La maturation des follicules primordiaux en pré-antraux au cours de la première vague est très rapide et ne présente que très peu de production d'androgènes par les cellules de la thèque alors recrutées. Pendant longtemps, il était supposé que le manque d'enzymes stéroïdogènes était la conséquence du manque de maturation des cellules de la thèque. Mais une étude de greffes d'ovaires néonataux ou adultes de rat chez des rats ovariectomisés a mis

en évidence que la première vague permet de faciliter la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Galas et al. 2012).

L'axe hypothalamo-hypophysaire* est le régulateur endocrinien de l'activité cyclique de l'ovaire. Son activité commence à la puberté et se poursuit jusqu'à la ménopause*. Au cours d'un cycle menstruel, un follicule va se développer afin de permettre l'ovulation avec l'expulsion d'un ovocyte mature prêt à être fécondé. A chaque début de cycle, la FSH stimule les cellules de la granulosa et ainsi la maturation d'un follicule ovarien. Au même moment, la LH stimule la sécrétion d'androgènes par les cellules de la thèque. C'est la phase folliculaire. La mise en place de cet axe est très importante pour le déroulement de la folliculogénèse. Lors de dérégulation de cet axe, des pathologies comme l'absence d'ovulation et/ou de dysménorrhée* peuvent survenir.

Au cours de cette première vague, la maturation des follicules est dépendante de la taille des ovocytes (Vanderfiyden, Telfer, et Eppig 1992). En effet, de nombreux facteurs d'origine ovocytaire sont nécessaires à la maintenance des follicules (comme *Figla*, *Nobox*, *Gdf9*, *Kit*) ; l'absence de l'ovocyte ou un retard dans la maturation de celui-ci entraîne l'atrésie* ou la dégénération des follicules.

Lorsque les cellules de la pré-granulosa se différencient en cellules de la granulosa, elles vont acquérir la capacité de produire l'AMH. Cette hormone va inhiber la croissance des follicules primordiaux et diminuer la sensibilité à la FSH des grands follicules pré-antraux et antraux. Au cours de la vie adulte, le niveau d'expression de l'AMH le plus élevé se trouve dans les cellules de la granulosa des grands follicules pré-antraux et des petits follicules antraux. De cette manière, AMH est en mesure de contrôler le nombre de grands follicules pré-antraux et de petits follicules antraux qui continuent de croître et qui peuvent atteindre le stade pré-ovulatoire (Durlinger, Visser, et Themmen 2002; Grujters et al. 2003).

Comme dit précédemment, après la puberté, les follicules pré-antraux de la deuxième vague rentrent en jeu et peuvent continuer leur croissance jusqu'à l'ovulation. Jusqu'à présent, la folliculogénèse de la première vague n'était pas régulée par les gonadotropines et les stéroïdes. Les follicules en croissance sont sélectionnés pour croître jusqu'au stade préovulatoire. La sélection des follicules en croissance est le résultat de la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'augmentation des niveaux de FSH au cours de chaque cycle de reproduction induit la croissance des grands follicules pré-antraux et des petits follicules antraux, qui sont suffisamment sensibles à la FSH. Ils seront sauvés de l'atrésie et vont devenir des follicules à antrum (McGee et Hsueh 2000).

L'antrum est une cavité remplie de liquide folliculaire. La formation de cette cavité est stimulée par la sécrétion de la FSH qui se lie à son récepteur exprimé à la surface des cellules de la

granulosa (Abel et al. 2000). La présence de l'antrum va permettre la caractérisation histologique de deux populations de cellules de la granulosa : les cellules de la granulosa murale en périphérie et les cellules de la granulosa du cumulus en contact direct avec l'ovocyte. Les informations externes sont captées par les cellules murales puis transmises aux cellules de la granulosa du cumulus, permettant la maturation finale de l'ovocyte. L'antrum va se développer jusqu'à occuper quasiment toute la place du follicule dit de Graaff. A ce stade les cellules murales produisent un pic d'œstrogène qui stimule la synthèse de LH. Les cellules de la thèque qui expriment le récepteur à la LH sont sensibles au pic de production de LH et l'ovulation sera induite (Erickson et al. 1985; Hirshfield 1991; Sánchez et al. 2010).

Antagonisme entre les deux voies

Lors de la formation de la gonade, les différentes lignées cellulaires somatiques partagent une origine initiale commune. Ainsi on observe des similitudes dans le développement des deux sexes (mâle et femelle). C'est le sexe chromosomique qui initie l'engagement dans une voie de différenciation ou dans l'autre (mâle ou femelle) pour donner naissance à deux sexes phénotypiquement différents.

Chez le mâle, dans le testicule, les tubes séminifères ou cordons testiculaires entourés d'une membrane basale entourent les futurs gamètes (cellules germinales sexuellement différenciées) soutenus par les cellules de Sertoli (exprimant les récepteurs à la FSH). Autour des cordons, le tissu interstitiel contient les cellules de Leydig (exprimant les récepteurs à la LH) qui sont proches des capillaires sanguins afin d'assurer l'activité de stéroïdogenèse du testicule. On retrouve le même schéma dans l'ovaire. Chaque futur gamète est soutenu dans un follicule composé de cellules de soutien, les cellules de la granulosa (exprimant les récepteurs à la FSH). Les follicules sont entourés d'une membrane basale les séparant du tissu interstitiel. Les cellules de la thèque (exprimant les récepteurs à la LH), productrices d'hormones ovariennes, sont localisées dans le tissu interstitiel proche de la vascularisation.

L'analyse transcriptomique de la gonade bipotentielle a mis en évidence que malgré la présence d'une détermination chromosomique dite « irréversible », les précurseurs somatiques possèdent la machinerie moléculaire pour les deux voies de différenciation sexuelle (Jameson et al. 2012). Il est donc nécessaire que soient mis en place des mécanismes antagonistes qui favorisent la différenciation d'un sexe en réprimant la différenciation de l'autre.

De nombreuses études chez la souris ont mis en évidence différents niveaux de régulation fine qui permettent d'éviter toute dérégulation de ces voies.

Antagonisme des voies au cours de l'embryogenèse

Pendant la période fœtale, deux voies de signalisation sont capables d'interagir afin de maintenir les programmes engagés en créant un antagonisme de régulation moléculaire :

- la voie de signalisation RSPO1/WNT/ β -catenin.
- la voie *Sry/Sox9/Fgf9*.

WNT4 et RSPO1, activateurs de la voie WNT/ β -catenin, sont exprimés très tôt dans la crête génitale (XX et XY), ils ne deviennent spécifiques de l'individu XX qu'à partir de 12.5 *jpc*. Des études *in vitro* ont montré que les protéines SRY et SOX9 sont capables de se lier

directement à la protéine β -catenin dans le noyau et ainsi réprimer la voie de signalisation RSPO1/WNT/ β -catenin. Chez les individus XY, la voie RSPO1/WNT/ β -catenin est réprimée via *Sry* et *Sox9*, le programme mâle est engagé et réprime la détermination ovarienne (Bernard et al. 2008; Y.-F. C. Lau et Li 2009). Plus tardivement dans les cellules de Sertoli, *Fgf9* est décrit comme un répresseur de *Wnt4* capable bloquer le développement ovarien (Jameson, Lin, et Capel 2012). L'étude de Kim et collègues (Kim et al. 2006) démontre que *Wnt4* et *Fgf9* sont antagonistes l'un de l'autre. Plus précisément, dans des mutants perte de fonction de *Fgf9*, l'inactivation de *Wnt4* permet de sauver l'inversion de sexe de type femelle XY observée chez le mutant de *Fgf9* et de rétablir un phénotype mâle (Jameson, Lin, et Capel 2012). Inversement, une étude chez la souris en mis en évidence que la stabilisation de β -caténine dans les cellules somatiques XY induit un développement ovarien (Maatouk et al. 2008). Néanmoins, à ce jour, les mécanismes moléculaires permettant de mettre en place cet antagonisme pendant la différenciation de la gonade ne sont pas clairement compris *in vivo*.

Antagonismes des voies chez l'adulte

Chez l'adulte, la voie de signalisation *Foxl2* joue une grande importance. Par exemple chez la souris, l'inactivation post-natale de *Foxl2* entraîne la réactivation rapide de facteurs testiculaires dans les cellules de la granulosa. Les cellules de la granulosa surexpriment les facteurs *Sox9* et *Dhh*. La réactivation de ces gènes entraîne une dédifférenciation des cellules de la granulosa, qui acquièrent des caractéristiques de cellules de Sertoli. On observe une inversion de sexe mâle XX (Uhlenhaut et al. 2009).

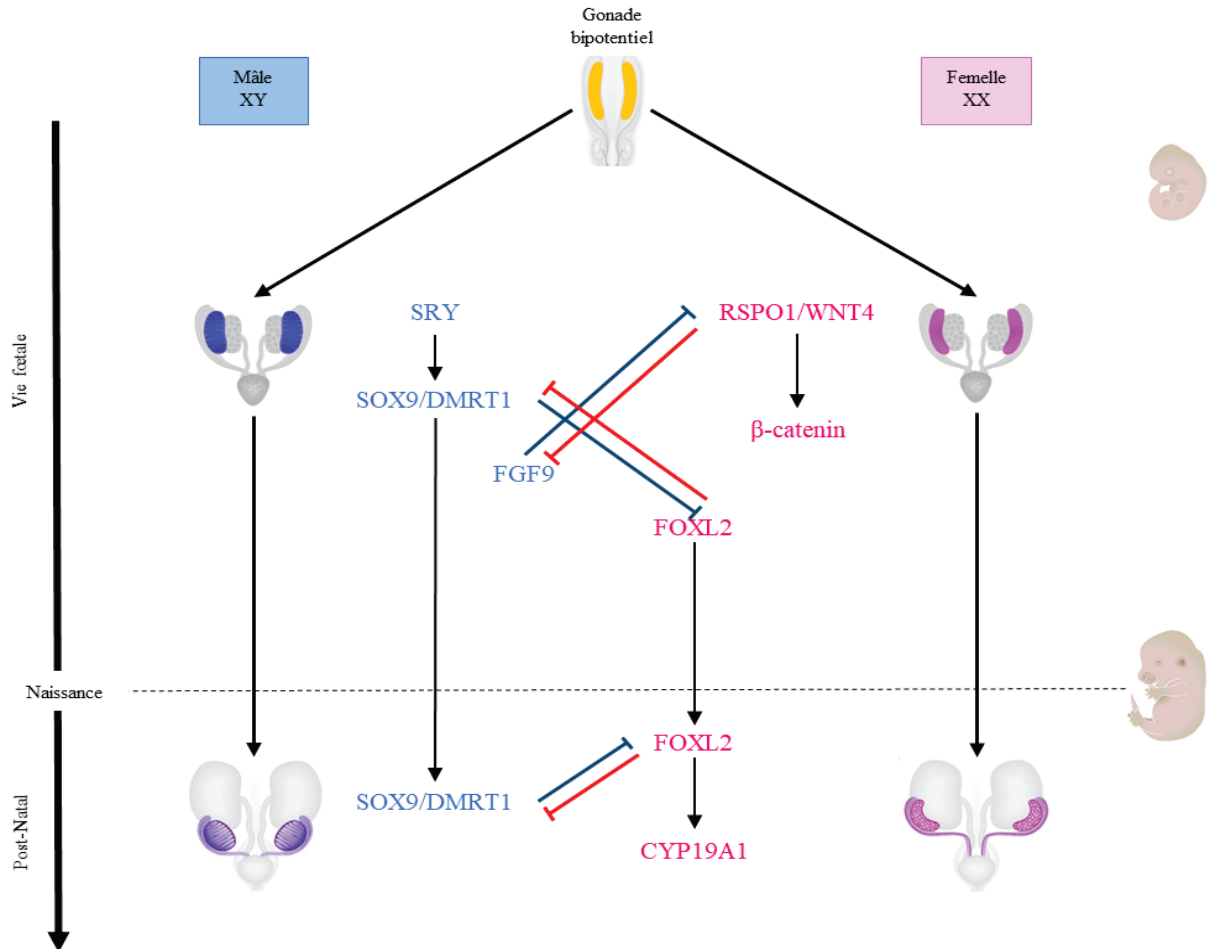
Cette étude prouve que même si le destin de l'ovaire adulte est bien établi, il est nécessaire que les voies femelles soit actives tout au long de la vie et répriment les voies mâles afin de maintenir le sexe femelle. Chez la souris, *Foxl2* est responsable du maintien du programme femelle en réprimant l'expression du gène *Sox9* responsable de l'établissement de la voie mâle.

Inversement, chez la souris mutante dans laquelle le gène *Dmrt1* est invalidé dans le testicule post-natal, on observe une réactivation de *Foxl2*. Les cellules de Sertoli n'expriment plus *Sox9*, entraînant une diminution de l'expression des autres facteurs de différenciation de la voie mâle. Les cellules de Sertoli acquièrent ainsi les caractéristiques de cellules de la granulosa (Matson et al. 2011).

Chez l'Homme, il a été montré, *in vitro*, dans une lignée cellulaire dérivant de tumeur de cellules de la granulosa, que CYP19A1 est une cible directe de FOLX2 pour la régulation de la production d'œstrogènes (Pannetier et al. 2005; N. I. Fleming et al. 2010). La concordance entre les gènes et les mécanismes d'antagonisme entre les voies mâle et femelle

suggère que ce mécanisme est conservé entre les espèces. Ainsi, chez l'adulte, il semblerait que différents mécanismes se mettent en place afin de maintenir le phénotype de la gonade en réprimant la voie de signalisation du sexe opposé, illustrant la très grande plasticité de ces différents types cellulaires tout au long de la vie de l'individu.

Figure 1.14 : Antagonisme entre les voies mâle et femelle



Chapitre 2 – Origine et mise en place de la lignée germinale

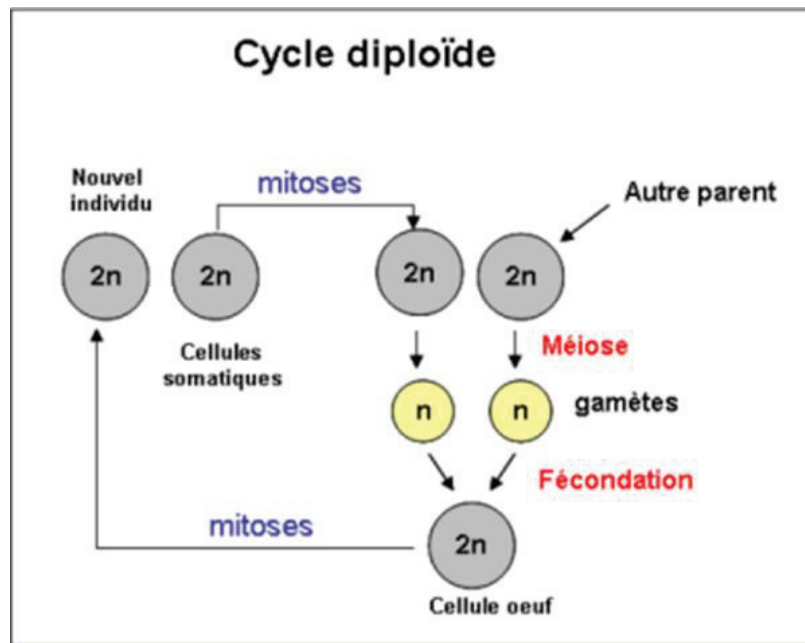
C'est lors d'une conférence en 1883, que le médecin Friedrich Leopold August Weismann, plus connu sous le nom d'August Weismann, a formulé pour la première fois la différence entre le « soma » (le corps) et le « germen » (les cellules de la lignée germinale). Il expliqua que les cellules somatiques sont les cellules qui constituent l'organisme, assurant sa vie. Et les cellules germinales, elles, sont les seules à pouvoir transmettre l'information génétique d'un organisme à sa descendance. Le « germen » est responsable de l'hérédité. Ces écrits ont été publiés en 1892 sous le titre « Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung » et ont fourni l'explication de la transmission de l'information génétique et ont donné l'essor de la génétique.

La reproduction sexuée est un processus fondamental en biologie qui permet à deux organismes parentaux de produire un nouvel organisme. Ce nouvel organisme est différent car il contient l'information génétique de ses deux parents, permettant ainsi la diversification génétique au sein des espèces. Le nouvel organisme vient de la fusion de deux cellules reproductrices que l'on appelle des gamètes*. Les gamètes sont des cellules haploïdes ne contenant qu'un seul exemplaire de chaque chromosome, soit n chromosomes, contrairement aux cellules somatiques qui sont diploïdes ($2n$ chromosomes).

Un individu diploïde mâle produit des gamètes haploïdes mâles qui devront fusionner avec des gamètes femelles pour former un zygote* et permettre la formation d'un nouvel organisme diploïde. La réduction chromosomique qui permet l'obtention des gamètes est une double division cellulaire constitutive particulière que l'on appelle la méiose. Ainsi, du point de vue chromosomique et de transmission de l'information génétique, le cycle de reproduction sexuée est marqué par deux événements majeurs communs à tous les métazoaires :

- la méiose permettant la formation de gamètes haploïdes à partir de cellules diploïdes ;
- la fécondation qui est l'union des 2 gamètes haploïdes, formant un zygote diploïde.

Figure 2.1 : Cycles diploïdes des métazoaires au cours de la reproduction sexuée.



Chez les mammifères, les gamètes sont appelés spermatozoïdes chez le mâle et ovocytes chez la femelle. Ces cellules de la lignée germinales sont produites dans les gonades différenciées adultes (testicules ou ovaires). Les cellules fondatrices des gamètes (cellules germinales) sont spécifiées au début du développement embryonnaire et vont se développer en gamètes matures en effectuant la méiose avant la fécondation (Mitinori Saitou 2009).

Dans les organismes multicellulaires, le développement adéquat des gonades et des cellules germinales est essentiel pour la transmission de l'information génétique aux générations suivantes et pour la survie de l'espèce. Le développement des cellules germinales est finement régulé pour contrôler la prolifération, la survie et la différenciation de ces cellules. La perturbation de ces mécanismes de contrôles peut conduire à l'hypofertilité, la stérilité ou à des tumeurs des cellules germinales (Dolci, Campolo, et De Felici 2015).

L'infertilité est un problème de santé publique majeur, avec une prévalence de 24 % de couples en France rencontrant des problèmes de fertilité après 1 an d'essais de conception infructueux. Ces couples, après un diagnostic d'infertilité, se dirigent dans de nombreux cas vers une Procréation Médicalement Assistée (PMA).

L'INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economique) rapporte, en 2015, 798 948 naissances en France dont 24 839 naissances après une PMA. Ce nombre représente 3,1% des enfants nés après une PMA. Il s'avère que depuis 2009 ce taux augmente chaque année (« Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique » 2016).

L'infertilité peut toucher les hommes comme les femmes : ainsi dans environ 30% des cas, c'est soit l'homme ou la femme qui rencontre un problème de fertilité, tandis que dans environ 30% des cas, les deux sont concernés, et enfin 10% des cas restent inexplicables.

Les causes de l'infertilité, multiples, ne sont pas toutes connues.

Chez la femme, elles peuvent être dues à des problèmes hormonaux (défaut de production), l'endométriose (obstruction des trompes par de l'inflammation, dérégulation des cycles menstruels...), ou à des infections génitales. De plus, 5 à 10% des femmes hypofertiles peuvent présenter des anomalies génétiques sous-jacentes telles que des aberrations chromosomiques, des mutations d'un ou plusieurs gènes et des polymorphismes. Une part importante de l'infertilité peut, au moins en partie, être expliquée par l'exposition à des facteurs environnementaux, des perturbations endocriniennes et des déséquilibres hormonaux (Tarín et al. 2015). Plusieurs études ont également décrit un risque accru de tumeurs malignes gynécologiques chez les femmes infertiles (Liat et al. 2012).

Chez les hommes, les causes principales de l'infertilité sont liées à des défauts de qualité du sperme :

- réduction du nombre ou de la mobilité (oligozoospermie, asthenozoospermie...);
- défauts d'ordre mécanique, occlusions des voies séminales ;
- infections par des bactéries (chlamydia, gonocoques, ...);
- problèmes hormonaux (défaut de production de la testostérone ;
- azoospermie complète (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat).

Les cancers sont aussi considérés comme des causes d'infertilité chez les patients. Il est avéré que les traitements contre le cancer (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie) modifient la qualité de vie des patients et peuvent altérer la fonction de reproduction (Hoog-Labouret et Merlet 2013).

Pour les enfants/adolescents et jeunes adultes atteints d'un cancer, il est indispensable de préserver la fertilité et cela devient donc une vraie préoccupation médicale. Depuis les années 1990, les équipes médicales et scientifiques ont mis en place des protocoles de conservation des gamètes. En France, chez l'homme, les spermatozoïdes sont cryoconservés (Hoog-Labouret et Merlet 2013) et chez la femme, il s'agit de cryoconservation de tissus ovariens (Dadoun et al. 2017).

A l'heure actuelle, malgré les progrès, les équipes médicales restent encore impuissantes devant les tumeurs des cellules germinales, d'autant plus que ces tumeurs surviennent principalement chez les nouveau-nés, les nourrissons, les enfants et les adolescents, plus rarement chez les adultes. Le traitement de première intention pour ces patients est souvent la chirurgie. Il est donc difficile de conserver la fertilité future de ces patients.

Les tumeurs des cellules germinales se localisent principalement dans les testicules et les ovaires, bien qu'elles puissent également se développer à l'extérieur de la gonade le long de la ligne médiane du corps et dans le cerveau. Elles représentent environ 98% des cas de cancer du testicule (Bosl et Motzer 1997) et seulement 2 à 3% des cas de cancer de l'ovaire (Permuth-Wey et Sellers 2009). Il existe de nombreuses similitudes entre les tumeurs des cellules germinales de l'ovaire et du testicule, notamment une ressemblance morphologique (souvent liée à une réactivation des caractéristiques des cellules germinales embryonnaires). De plus des études génétiques ont rapporté des caractères héréditaires dans des familles qui présentaient ce type de tumeurs ovariennes et testiculaires, suggérant ainsi une étiologie génétique commune (Dolci et al. 2015).

Les tumeurs germinales testiculaires (TGCT) représentent la malignité solide* la plus répandue chez les hommes âgés de 15 à 35 ans (Oosterhuis et Looijenga 2005).

Elles peuvent être divisées en trois classes :

- Les TGCT de type I

Ces TGCT sont typiques des nouveau-nés, ou des enfants en bas âge et peuvent se développer en tératomes bénins* ou tumeurs du sac vitellin. Elles se retrouvent également localisées dans la ligne médiane du corps, cerveau et cou. Elles auraient pour origine des cellules germinales précoces en migration (Bussey et al. 2001; Oosterhuis et Looijenga 2003).

- Les TGCT de type II

Ces tumeurs surviennent après la puberté chez les jeunes hommes. Elles sont localisées dans le testicule et sont caractérisées comme des carcinomes *in situ** (stade précoce de cancer caractérisé par une prolifération de cellules épithéliales cancéreuses ne franchissant pas la membrane basale). Ces tumeurs ont deux origines : des cellules germinales primordiales ou des cellules germinales qui ont commencé à se différencier en spermatogonies (Skakkebaek et al. 1987; Reuter 2005). Les TGCT de type II peuvent se développer en séminome, en non-séminome ou en une forme mixte, tous présentant des marqueurs des cellules germinales primordiales fœtales. Les séminomes sont les cas de cancer testiculaire les moins agressifs. Les non-séminomes regroupent différents types de cancers avec une composante maligne telle que la différenciation des cellules pluripotentes en carcinomes embryonnaires*, choriocarcinomes*, tératomes matures* ou tumeurs mixtes (Sonne et al. 2009).

- Les TGCT de type III

Les tumeurs testiculaires de types III touchent seulement les hommes âgés et restent relativement rares. Ces tumeurs sont des séminomes spermatocytaires. Ils proviendraient de spermatogonies ou de spermatocytes qui n'effectuent plus une spermatogenèse normale (Oosterhuis et Looijenga 2005).

Les tumeurs germinales ovariennes (OGCT) représentent environ 1 à 2% des affections malignes ovariennes (Quirk, Natarajan, et Mettlin 2005).

Les tumeurs germinales ovariennes sont très diversifiées et elles sont classées en trois catégories : les OCCT primitives (généralement malignes), les tératomes matures et les kystes dermoïdes (Roth et Talerman 2006). Les tumeurs germinales ovariennes primitives présentent de nombreuses cellules germinales immatures dérivées des cordons sexuels. L'histologie de ces cancers les classe dans les carcinomes *in situ*. Par analogie avec les TGCT, il semble que la plupart des OGCT primitives dérivent directement de cellules germinales primordiales (Gershenson 2007). Les tératomes et les kystes dermoïdes sont susceptibles de provenir d'ovocytes activés par des mécanismes parthénogénétiques (Adhya et Mohanty 2019). Ces cancers étant très rares (8 femmes sur 100 000 de moins de 30 ans), les causes moléculaires et génétiques ne sont pas connues (« Classification des tumeurs de l'ovaire (d'après OMS 2003) » 2003) .

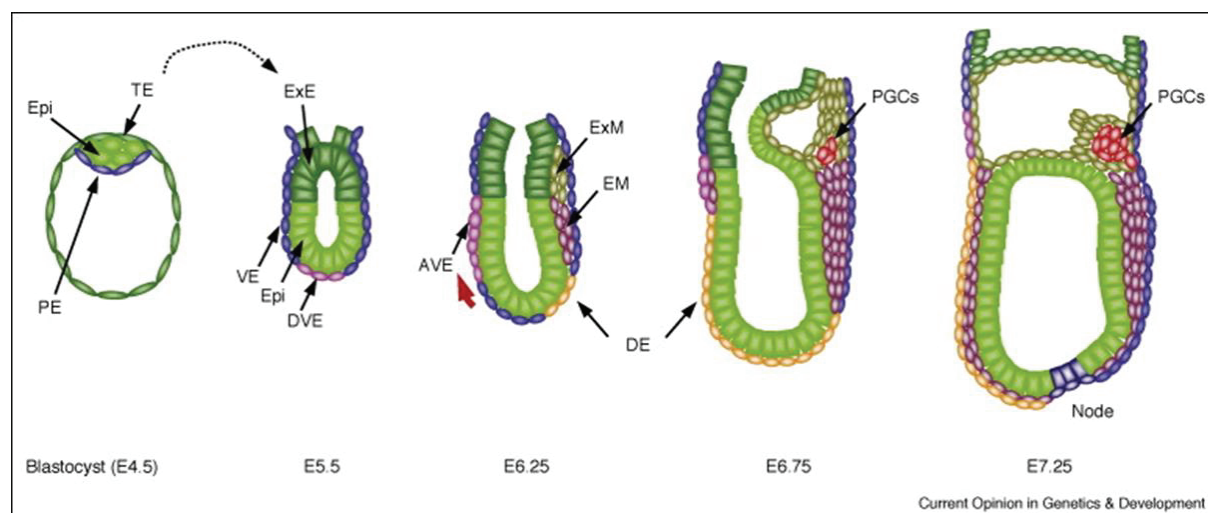
Pour résumer, la plupart de ces tumeurs des deux sexes proviennent de cellules germinales primordiales défectueuses. En effet, des anomalies lors du remodelage épigénétique, dans la prolifération, l'apoptose ou l'engagement dans la méiose peuvent être des initiateurs potentiels de tumeurs des cellules germinales. De plus les caractéristiques uniques de ces cellules et la pluripotence latente des cellules germinales et des gonocytes/spermatogonies rendent ces cellules sujettes à des transformations cellulaires et augmentent les aspects multiformes des tumeurs des cellules germinales. Au cours de ce chapitre, nous décrirons les mécanismes de la mise en place des cellules germinales jusqu'à la formation des gamètes compétents pour la fécondation chez la souris, modèle qui nous apporte le plus d'informations génétiques et moléculaires à ce jour.

Approche historique et origine de la mise en place de la lignée germinale

Les premières descriptions histologiques des cellules germinales ont eu lieu chez l'Homme dans les années 1910. Les études de Fuss et Felix décrivent des grandes cellules rondes localisées dans l'endoderme de la vésicule vitelline chez des embryons humains de 23 à 26 *jpc* (Felix.1911 ; Fuss. 1912 : référence non disponible en anglais). Ce n'est que 50 ans plus tard qu'un immunomarquage de la *Tissue non-specific alkaline phosphatase* (TNAP) permet d'identifier les cellules germinales dans des embryons de souris (Chiquoine 1954). Les cellules germinales sont localisées au niveau de l'allantoïde et du mésoderme de la vésicule vitelline à 8 *jpc*. Dans les années 1990, une équipe met au point un marquage à la phosphatase alcaline (ALP) des cellules germinales sur des embryons de souris entiers, permettant d'identifier 8 cellules marquées juste en arrière de la ligne primitive définitive du mésoderme extra-embryonnaire, séparée de l'embryon par le pli amniotique à 7 *jpc*. Ensuite, vers la fin de la gastrulation, le nombre de cellules ALP-positives extra-embryonnaires augmente jusqu'à 50 à 80 cellules. A 8 *jpc*, dans le domaine extra-embryonnaire, le nombre de cellules germinales diminue avec l'apparition d'environ 125 cellules germinales ALP-positives localisées dans l'endoderme de l'intestin postérieur et également à la base de l'allantoïde (Ginsburg, Snow, et McLaren 1990). Ces observations suggèrent que les cellules germinales doivent être spécifiées dans le domaine extra-embryonnaire avant de migrer en direction de la gonade.

En effet, Lawson et Hage démontrent par des expériences de transplantation d'épiblaste que chez la souris, les précurseurs des cellules germinales proviennent de l'épiblaste. Dans l'embryon de souris ayant subi une transplantation d'un épiblaste proximal en position distale, l'épiblaste va alors se différencier en ectoderme neuronal et non en cellules germinales. Dans la même expérience, lors d'une greffe d'un épiblaste distal en position proximale, on observe une spécification des cellules germinales (K. A. Lawson et Hage 1994). Cette étude confirme l'origine des cellules germinales et suggère que ces cellules reçoivent des signaux provenant de l'environnement influençant leur spécification.

Figure 2.2 : Origine des cellules germinales primordiales



TE : trophoblaste, Epi : cellules épiblastiques pluripotentes, PE : endoderme primitif différencié de l'épiblaste, ExE : ectoderme extra-embryonnaire, VE : endoderme viscéral, DVE : endoderme viscéral distal, AVE : endoderme viscéral antérieur, ExM : mésoderme extra-embryonnaire, EM : mésoderme embryonnaire, DE : endoderme définitif et PGC : cellules germinales primordiales.

Ainsi au cours de l'embryogenèse, les cellules germinales apparaissent à 6 *jpc* dans l'épiblaste proximal proche de l'ectoderme extra-embryonnaire. Au cours de la gastrulation, soit à 6,5 *jpc*, les cellules vont se retrouver localisées dans la partie postérieure de la ligne primitive de la région extra-embryonnaire à la base de l'allantoïde. Les cellules germinales restent restreintes à la base de l'allantoïde jusqu'au stade de 8 *jpc*, il semble que la localisation extra-embryonnaire confère le potentiel de spécification des cellules germinales à ce stade de développement (Felici 2013).

A partir de ce stade et jusqu'à leur migration dans la crête génitale, les cellules germinales sont identifiées comme les cellules germinales primordiales (PGC) par l'expression de certains gènes tels que *Tnap*, codant pour la phosphatase alcaline, et des gènes de pluripotence, *Fucosyltransférase 4 (Fut4 ou Ssea-1)*, *POU Class 5 Homeobox 1 (Pou5f1 ou Oct3/4)* et *Developmental Pluripotency-Associated Protein 3 (Dppa3, aussi connu sous son ancien nom Stella, ou germ cell primitive 7, Pgc7)* (M. Sato et al. 2002), des gènes également caractéristiques des cellules souches embryonnaires (Hahnel et Eddy 1986; Mitinori Saitou, Barton, et Surani 2002).

Spécification de la lignée germinale

Préformation ou épigénèse des cellules germinales primordiales

Les cellules germinales sont différentes des cellules somatiques en ce sens qu'elles ont la capacité de donner naissance à un nouvel organisme. Ce sont des cellules pluripotentes immortelles qui ont la capacité de se différencier en gamètes pour initier la méiose avant d'être fécondés par un autre gamète. Cet état souche soulève la question de savoir quand et comment les cellules germinales sont différenciées des cellules somatiques et comment elles conservent leur potentialité de pluripotence pendant le développement jusqu'à la différenciation en spermatozoïdes et en ovules.

Il existe deux mécanismes distincts pour la spécification de la lignée des cellules germinales : l'un consiste à hériter de déterminants localisés, souvent appelés plasma germinatif, dans l'œuf (préformation), et l'autre consiste à induire des cellules embryonnaires pluripotentes (épigénèse). D'un point de vue phylogénique, il semblerait que le mode d'épigénèse est le plus répandu et plus ancestral que les métazoaires. Le mode de préformation semble être apparu de façon indépendante à plusieurs reprises, probablement en raison de sa meilleure capacité à sécuriser la lignée germinale dès le début du développement (pour revue voir (Extavour et Akam 2003)).

Chez de nombreuses espèces métazoaires en dehors des mammifères (comme la *Drosophile*, le Poisson-zèbre et le nématode *C. Elegans*), les cellules germinales se forment dans un cytoplasme spécialisé (plasma germinatif*), qui contient des déterminants des cellules germinales (Starz-Gaiano et Lehmann 2001).

Chez la *Drosophile*, le plasma germinatif est transmis par la mère et contient de grandes structures riches en ribosomes appelées granules polaires. La transplantation du plasma germinatif à la partie antérieure de l'embryon peut donner naissance à des cellules germinales fonctionnelles, ce qui suggère que les facteurs contenus dans le plasma germinatif sont suffisants pour spécifier les cellules germinales (Illmensee et Mahowald 1974). La formation et la localisation du plasma germinatif dépendent du gène *Oskar*. *Oskar* est en amont ou agit conjointement avec d'autres gènes tels que *DEAD-Box Helicase 4* (*Ddx4* ou aussi appelé *Vasa*) pour former le plasma germinatif et spécifier les cellules germinales (Hay et al. 1988; Ephrussi et Lehmann 1992; S. S. Tanaka et al. 2000). Le gène *Nanos* est également localisé dans le plasma germinatif et est nécessaire à la spécification des cellules germinales chez la drosophile

(Forbes et Lehmann 1998). *Nanos* et *Ddx4* sont tous les deux des gènes extrêmement conservés puisque qu'ils sont retrouvés comme des gènes spécifiques des cellules germinales chez de nombreuses espèces comme le Poisson zèbre, des organisme non bilatériens comme les Cnidaires ou les mammifères (Souris et Homme) (Yoon, Kawakami, et Hopkins 1997; Castrillon et al. 2000; S. S. Tanaka et al. 2000; Leclère et al. 2012; Starz-Gaiano et Lehmann 2001).

Même si la préformation et l'épigenèse sont deux mécanismes relativement différents, certains gènes ainsi que certaines propriétés de spécification sont conservés. En épigenèse ou préformation, il est nécessaire de réprimer dans les PGC le programme de différenciation somatique activé de manière robuste dans les cellules somatiques environnantes. Chez la drosophile et le nématode, la répression du programme somatique est maintenue par la répression de l'activité de l'ARN polymérase II (Pol II) par la protéine maternel PIE-1 (A. Nakamura et al. 1996; Ghosh et Seydoux 2008).

Chez les mammifères, il n'y pas de plasma germinatif (Ciemerych, Mesnard, et Zernicka-Goetz 2000). Le développement de l'embryon suit un mécanisme d'épigenèse : ainsi les cellules germinales primordiales seront induites par un signal somatique qui se diffuse au sein de l'épiblaste à 7 *jpc* et les cellules sensibles à ce signal se dirigeront vers un destin germinal.

La spécification : voies de signalisation induisant la formation des cellules germinales primordiales chez la souris

La spécification du destin des cellules germinales correspond à la ségrégation d'un groupe de cellules en cellules germinales primordiales, issues de lignées somatiques. En effet, les cellules germinales identifiées à 6 *jpc* ne sont pas encore spécifiées, elles acquièrent les caractéristiques de cellules germinales primordiales (cellules positives pour l'ALP et exprimant des gènes spécifiques à la lignée germinale comme *Dppa3* et *Fragilis*) à partir de 7 *jpc*.

Deux gènes, *Dppa3* et *Fragilis*, sont fortement et spécifiquement exprimés dans les cellules germinales primordiales (Mitinori Saitou, Barton, et Surani 2002). *Fragilis* est également connu sous le nom de *mouse interferon-induced protein like gene-1 (mil-1)* ou *interferon-induced transmembrane protein 3 (Ifitm3)* (S. S. Tanaka et Matsui 2002). Il appartient à la famille des protéines transmembranaires inductibles par l'interféron. *Dppa3* est une petite protéine de navette nucléo-cytoplasmique. Les cellules positives pour *Fragilis* présentent une

expression élevée de la phosphatase alcaline et répriment l'expression de gènes *homéobox* du programme somatique mésodermique tels que *Hoxb1* et *Hoxa1* (Mitinori Saitou, Barton, et Surani 2002).

Des études d'inactivation de ces gènes chez la souris ont révélé que ni *Fragilis* ni *Dppa3* ne sont nécessaires à la spécification des cellules germinales primordiales (Payer et al. 2003). Cependant *Dppa3* est un facteur important pour la protection du génome maternel et des gènes à empreinte paternelle de la déméthylation de l'ADN du génome à l'échelle du zygote (T. Nakamura et al. 2007).

La famille des gènes *Bone Morphogenetic Proteins (Bmp)* est initialement exprimée dans l'ectoderme extra-embryonnaire en contact direct avec l'épiblaste proximal à 5.5 *jpc*. Plus précisément, le modèle murin perte de fonction pour le gène *Bmp4* présente une déficience en cellules germinales primordiales dans les embryons entre 7.2 et 7.75 *jpc* (Lawson et al. 1999). De plus, l'analyse des mutants *Bmp4^{+/-}* (hétérozygotes pour ce gène) montre une réduction de moitié des cellules germinales primordiales. Cependant, cette étude relève que *Bmp4* ne peut pas agir seul et qu'il y a d'autres signaux qui interviennent dans la spécification des cellules germinales.

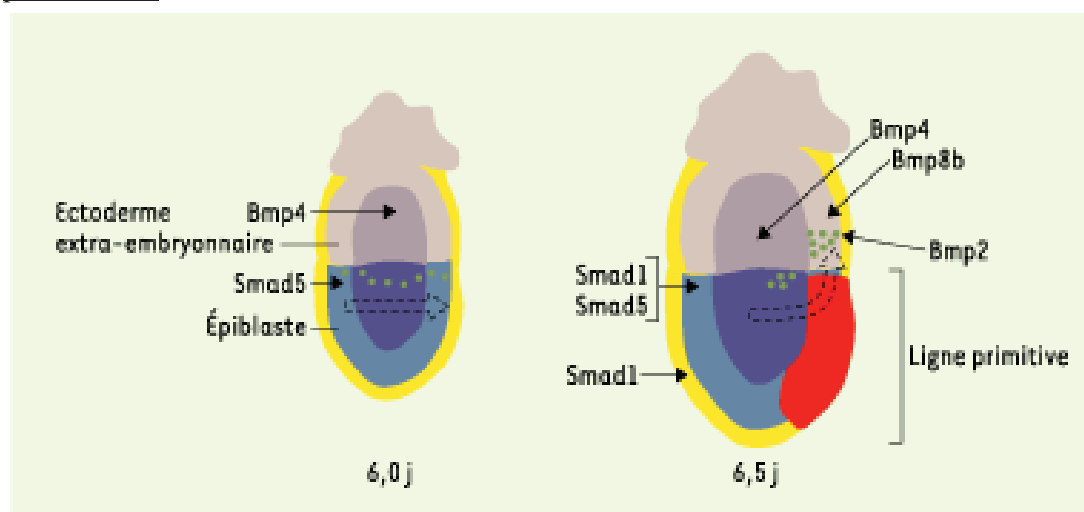
En effet, l'inactivation chez la souris des gènes *Bmp2* et *Bmp8b* induit une absence totale de cellules germinales primordiales (Ying et al. 2000; Ying et Zhao 2001). Les BMPs sont des facteurs de croissance qui appartiennent à la famille des TGF β . Les protéines BMPs diffusent dans les tissus comme des morphogènes et vont se lier à leurs ligands pour transduire le signal, ce sont des cytokines*.

On retrouve le même phénotype d'absence ou de nombre réduit de cellules germinales primordiales dans les modèles d'inactivation des gènes des autres membres de la voie de signalisation des BMPs :

- les récepteurs, Activin A receptor type I (*Acvr1* ou *Alk2*) (de Sousa Lopes et al. 2004) ;
- les transducteurs du signal, Mothers against decapentaplegic homolog family member 1 (*SMAD1* et *SMAD5*) (Chang et Matzuk 2001; Tremblay, Dunn, et Robertson 2001).

A 6-6,5 *jpc*, l'épiblaste proximal est exposé au BMP4, synthétisé par l'ectoderme extra-embryonnaire. Cette première exposition confère à l'épiblaste la capacité à se différencier en cellules germinales primordiales. La restriction du signal afin d'éviter de spécifier tout l'épiblaste est contrôlée par les protéines BMP8b, provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire et BMP2 sécrété à partir de l'endoderme viscéral (Dudley et al. 2010).

Figure 2.3 : Voie de signalisation des BMPs et spécification des cellules germinales primordiales.



Issu de (Machev, Fuhrmann, et Viville 2004)

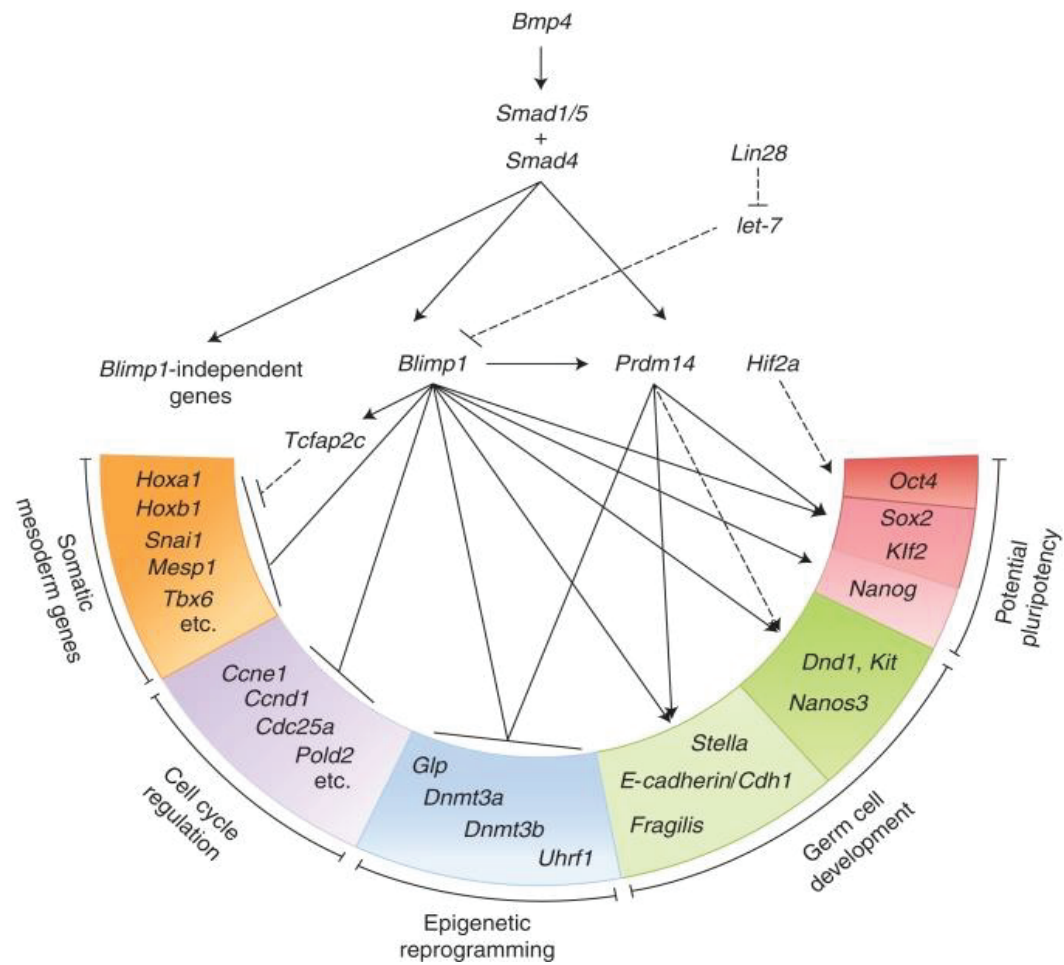
Au cours de la spécification à 6,25-6,5 *jpc*, en aval de *Bmp4*, les gènes *B-lymphocyte induced maturation protein 1* (*Blimp1* connu aussi sous le nom *Prdm14*) et *Prdm14* sont exprimés dans les cellules germinales primordiales qui ont déjà acquis l'activité APL et qui sont positives pour *Dppa3a* (Mitinori Saitou, Barton, et Surani 2002). Ces deux gènes sont des régulateurs de la transcription et ils ont été identifiés comme des facteurs clés pour la spécification des cellules germinales (Ohinata et al. 2005; Yamaji et al. 2008). Des études d'inactivation de ces gènes ont montré qu'ils interviennent dans des événements clés de la spécification : la répression du programme somatique mésodermique (Mitinori Saitou, Barton, et Surani 2002), la ré-acquisition de l'état pluripotent (Yabuta et al. 2006) et la reprogrammation épigénétique (Seki et al. 2007).

Le modèle perte de fonction pour le gène *Blimp1* a permis de montrer que BLIMP1 est avant tout un puissant répresseur de transcription responsable de la répression des gènes somatiques. Avant l'expression de *Blimp1*, les cellules germinales primordiales expriment initialement les gènes *Hox* (gènes spécifiques de la lignée du mésoderme somatique) et répriment *SRY-Box2* (ou *Sox2*, un gène de pluripotence exprimé par les cellules germinales primordiales) (Yabuta et al. 2006; Kurimoto et al. 2008). A partir de 6.75 *jpc*, les cellules positives pour *Blimp1* commencent à réprimer les gènes *Hox* et à exprimer *Sox2*, *Stella* et *Nanog Homeobox* (*Nanog*). L'expression de *Blimp1* est responsable de la régulation positive d'environ 500 gènes de spécification des PGC et la régulation négative d'environ 330 gènes du programme somatique (voir pour plus de détails (Yabuta et al. 2006; Kurimoto et al. 2008)).

Tcfap2c est en aval de *Blimp1* et agit également comme un répresseur de programme somatique. La suppression spécifique dans l'épiblaste de *Tcfap2c* entraîne une réduction drastique du nombre de cellules germinales primordiales et, après la phase de migration, l'absence complète de ces cellules (Weber et al. 2010).

Dans le modèle murin déficient en *Prdm14*, on observe que les cellules ne parviennent pas à réactiver *Sox2*, bien qu'elles répriment normalement le programme mésodermique somatique. Les cellules germinales primordiales ne parviennent pas non plus à réprimer la Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 1 (EHMT1), une enzyme essentielle à la modification de H3K9me2 à l'échelle du génome (Tachibana et al. 2005). Dans ce mutant, les cellules ne peuvent pas réguler les niveaux de H3K9me2 et H3K27me3 nécessaires pour l'acquisition de la reprogrammation épigénétique des cellules germinales primordiales (Yamaji et al. 2008).

Figure 2.4 : Représentation schématique d'un réseau génétique potentiel pour la spécification PGC.



Issu de (Mitinori Saitou et Yamaji 2012). Les flèches en pointillés représentent les conclusions d'études *in vitro*.

Enfin, une dernière voie de signalisation est décrite comme essentielle pour le destin des cellules germinales primordiales : la voie de signalisation WNT/ β -caténine. Le ligand WNT3 est exprimé dans l'épiblaste et l'endoderme viscéral à 5.5*jpc* (P. Liu et al. 1999). Les cellules d'épiblaste invalidées pour *Wnt3* ne montrent pas d'expression de *Blimp1* en réponse à BMP4, suggérant que WNT3 peut amorcer l'épiblaste pour qu'il exprime *Blimp1* (Ohinata et al. 2009).

La signalisation *Wnt* peut agir sur les composants de la voie de signalisation BMP. En effet, la voie *Wnt* peut stabiliser SMAD1 dans sa région de liaison et empêcher sa dégradation, en inhibant la phosphorylation médiée par GSK3 (Fuentelba et al. 2007; Sapkota et al. 2007). A 5.5 *jpc*, l'épiblaste des embryons de souris exprime les transducteurs du signal SMAD1 et SMAD5 de la voie de signalisation BMP, ce qui suggère que WNT3 intervient à ce niveau pour réguler la spécification des cellules germinales primordiales (Ohinata et al. 2009).

Profil d'expression génique des cellules germinales primordiales

Gènes de pluripotence

Les cellules germinales primordiales sont connues depuis longtemps pour leur implication dans les tératomes qui sont des tumeurs de cellules pluripotentes (Stevens 1964). Avant la spécification, les cellules germinales ont des caractéristiques mésodermiques et ont perdu l'expression génique des cellules pluripotentes. La spécification permet la ré-activation des gènes de pluripotence.

L'étude des tératomes et des cellules souches qui en dérivent *in vitro* a permis d'établir des protocoles de dérivation des cellules souches embryonnaires à partir de la masse interne du blastocyte (M. J. Evans et Kaufman 1981). La dérivation des cellules souches embryonnaires (ESC) a permis l'étude *in vitro* des mécanismes sous-jacents de la pluripotence cellulaire. Ainsi la pluripotence est régulée et maintenue de manière stable principalement par un réseau de régulateurs de transcription centraux, *Pou5fl*, *Sox2* et *Nanog* (Niwa 2007; R. A. Young 2011). Pour plus de détails, voir le chapitre 3 : « La voie de signalisation WNT/ β -caténine ».

Ces facteurs de transcription et marqueurs de pluripotence sont exprimés dans la masse interne du blastocyte et l'épiblaste précoce. Lors de la différenciation de l'épiblaste, les marqueurs de pluripotence *Sox2* et *Nanog* vont être régulés négativement, en particulier dans les régions postérieures. Seul *Pou5fl* n'est pas dérégulé et maintient son expression dans l'épiblaste. Ainsi au cours de la spécification, les cellules germinales primordiales réacquièrent le réseau de gènes clés pour la pluripotence, elles continuent à exprimer *Pou5fl* et retrouvent l'expression de *Sox2* et *Nanog* à partir de 7 *jpc* (Mitinori Saitou et Yamaji 2012).

Les fonctions des gènes de pluripotence dans les cellules germinales primordiales

Les cellules germinales primordiales présentent des similitudes entre la masse interne du blastocyte et les cellules souches embryonnaires en ce qui concerne l'expression des gènes de pluripotence. Mais les cellules germinales primordiales sont uniques car elles présentent un potentiel de méiose (Magnúsdóttir et Surani 2014). Cependant, la plupart des études sur les fonctions des gènes de pluripotence ont été réalisées *in vitro* sur des cellules souches embryonnaires (ESC). Les gènes associés à la pluripotence sont essentiels pour la spécification, la prolifération et la survie des cellules germinales primordiales.

Pou5f1 et *Nanog* sont essentiels à l'émergence des cellules germinales primordiales. La suppression conditionnelle de *Pou5f1* ou la suppression conditionnelle de *Nanog* dans les cellules germinales primordiales à 7,25 *jpc* entraîne la mort de celles-ci par apoptose (Kehler et al. 2004; Chambers et al. 2007; Yamaguchi et al. 2009).

De plus, *Pou5f1* est nécessaire au maintien de l'état de pluripotence et d'auto-renouvellement des ESC en culture (voir Chapitre 3 : « La voie de signalisation WNT/ β -catenin »). L'absence du facteur de transcription *Pou5f1* entraîne la différenciation des cellules souches embryonnaires en culture (Niwa, Miyazaki, et Smith 2000).

Ces résultats montrent que l'expression de *Pou5f1* et *Nanog* est impliquée non seulement dans l'émergence des cellules germinales primordiales mais surtout dans le maintien de la pluripotence de ces cellules. *Pou5f1* est régulé par Hypoxia-inducible factor 2a (HIF2 α), dont la perte de fonction dans l'embryon de souris entraîne une perte complète des cellules germinales. *Hif2a* est donc également essentiel pour la spécification des cellules germinales primordiales et/ou la survie en régulant l'expression de *Pou5f1* (Covello et al. 2006).

Un autre facteur clé de la pluripotence décrit dans les cellules souches est *Lin28*. Il est également exprimé dans les cellules germinales primordiales (Gangaraju et Lin 2009). La perte de fonction de *Lin28* entraîne une diminution du nombre de cellules germinales dans l'embryon de souris (West et al. 2009). *Lin28* est un régulateur négatif de *let-7 microARN (miARN let-7)*. Le *miARN let-7* est connu pour inhiber la traduction de l'ARNm de *Blimp1* en se liant à son 3'UTR (Nie et al. 2008). Ainsi une étude propose que *Lin28* active *Blimp1* en bloquant la maturation de *let-7* fonctionnel (West et al. 2009).

Le microARN *Mir-290-295* est également connu pour être nécessaire à l'induction de la pluripotence. Il est exprimé dans les embryons précoces, les cellules souches embryonnaires et les cellules germinales primordiales (Houbaviy, Murray, et Sharp 2003; Judson et al. 2009). L'invalidation de ce micro ARN chez la souris conduit à la diminution du nombre de cellules germinales et à une infertilité chez les souris XX (Medeiros et al. 2011). Il semble que l'infertilité soit due à un défaut de prolifération et de migration des cellules germinales primordiales.

Outre les marqueurs cités ci-dessus, les cellules germinales primordiales expriment le marqueur de pluripotence *Ssea-1* (ou *Fut 4*). Le gène *Ssea-1* est impliqué dans la génération de structures glucidiques fucosylées. Il est exprimé dans les cellules souches de la moelle osseuse et les cellules souches neurales (Capela et Temple 2002; Anjos-Afonso et Bonnet 2007). Le rôle de *Ssea-1* dans les cellules germinales reste encore à ce jour peu étudié,

cependant il est exprimé dans les cellules germinales primordiales en prolifération et il est ré-exprimé dans les tumeurs de cellules germinales testiculaires (Zechel et al. 2011).

Enfin chez l'Homme, on retrouve les mêmes marqueurs de pluripotence exprimés dans les cellules germinales primordiales (*Pou5f1*, *Nanog*, *Lin28* et *Ssea-1*), à l'exception de *Sox2*. *Sox2* n'est pas exprimé dans les cellules germinales primordiales humaines où il serait remplacé par *Sox17*, alors nécessaire à la spécification des cellules germinales primordiales (Irie et al. 2015).

Ainsi, les cellules germinales primordiales de souris stimulent l'expression des facteurs de transcription de pluripotence de la spécification jusqu'au moment de la différenciation sexuelle et l'entrée en méiose. L'expression des gènes de pluripotence dans les PGC est probablement complémentaire et permissive pour l'initiation d'un programme épigénétique, tel que la reprogrammation épigénétique des cellules germinales (voir ci-dessous paragraphe « Reprogrammation épigénétique) (Leitch et al. 2013).

Gènes associés à la prolifération et à la survie des cellules germinales primordiales

Les cellules germinales prolifèrent entre 7 et 13.5 *jpc*

Les cellules germinales sont des cellules qui prolifèrent entre la spécification (7 *jpc*) et jusqu'à l'arrêt mitotique avant l'entrée en méiose (13.5 *jpc*) (Farini 2011). Comme dans la plupart des tissus, les facteurs de croissance et cytokines affectent positivement ou négativement la prolifération et la survie des cellules germinales primordiales *in vivo* et *in vitro*. On retrouve les *Fibroblast growth factor 2 et 9* (FGF2 et FGF9), la famille FGF possédant de grandes activités mitogènes et de survie cellulaire, BMP4 et BMP7, le *Stem cell Factor* (SCF), *Leukemia inhibitory factor* (LIF) les TGF β (pour plus de détails voir la revue (Farini 2011)). Des études récentes ont rapporté que le *17- β -estradiol* (E2) était également capable de moduler la prolifération des cellules germinales primordiales chez la souris. Le E2 active les voies PI3K en activant la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et des Map Kinases (MAK) de PI3K, MAPK et Non-receptor tyrosine kinase (SRC) (Song, Zhang, et Santen 2005). A partir de cellules germinales primordiales de souris isolées et mises en culture, il a été mis en évidence que le traitement avec E2 entraîne une augmentation de la prolifération ainsi que l'activation de la voie PI3K dans les cellules germinales primordiales spécifiquement (La Sala, Farini, et De Felici 2010).

Des études chez la souris invalidée pour les locus *Germ cell deficient* (*Gcd*) et *Teratoma* (*Ter*) décrivent des phénotypes affectant la prolifération des cellules germinales primordiales. La délétion de *Gcd* comprend le gène *Proliferation of germ cells* (*Pog*). *Pog* est critique pour la prolifération normale des cellules germinales primordiales, entre 9,5 et 10,25 *jpc* lorsque les cellules germinales commencent à migrer vers la crête génitale en développement. Les souris déficientes pour *Pog* présentent un nombre réduit de cellules germinales primordiales et une infertilité à l'âge adulte qui est due à une prolifération réduite des cellules germinales primordiales plutôt qu'à une migration aberrante (AgoulNIK et al. 2002). *In vitro* l'invalidation des gènes *Bmp7* et *Fgf9* entraîne une diminution importante du nombre de cellules germinales primordiales (DiNapoli, Batchvarov, et Capel 2006; Ross, Munger, et Capel 2007). De plus, la perte de fonction de *Interleukin 2* (*IL2*) (Eguizabal et al. 2002), *Bmp4*, *Fgf2*, *Tnfa* (Resnick et al. 1992) respectivement, et de la voie de l'acide réinoïque (*AR*) (Uichi Koshimizu, Watanabe, et Nakatsuji 1995), entraîne une diminution de la prolifération des cellules germinales primordiales. D'autres études *in vitro* ont pu montrer que les Interleukines 4, 6 et 11 et le LIF sont impliqués dans la survie des cellules germinales en inhibant les voies

de l'apoptose (De Felici et Dolci 1991; Cooke, Heasman, et Wylie 1996; U. Koshimizu et al. 1996).

Deux études *in vivo* chez la souris ont montré que la voie WNT/ β -catenin est également impliquée dans la prolifération des cellules germinales. Les souris surexprimant de manière spécifique β -catenin dans les cellules germinales (*Tnap-Cre* ; βcat^{Exon3}) présentent une diminution du nombre de cellules germinales à la naissance due à un retard dans la progression du cycle cellulaire (Kimura et al. 2006). La perte de fonction de la protéine RSPO1 entraîne également une diminution importante du nombre de cellules germinales en prolifération chez la souris XX (Chassot et al. 2011). Ces résultats indiquent que la voie WNT/ β -catenin est impliquée dans le développement des cellules germinales entre 10.5 et 13.5 *jpc*.

Enfin, *Ddx4*, l'homologue souris du gène *Vasa* de la drosophile, est exprimé à partir de 10.5 *jpc* dans les cellules germinales primordiales. L'ablation de ce gène chez la souris XY entraîne un défaut de prolifération des cellules germinales primordiales qui colonisent les gonades mâles, et l'expression de *Pou5fl* semble également être réduite. Les souris adultes sont infertiles et ne produisent pas de spermatozoïdes dans les testicules (S. S. Tanaka et al. 2000).

La mort cellulaire des cellules germinales maintient leur bon nombre

Le locus *Ter* correspond au gène *Dead end -1 (Dnd)*, codant pour une protéine de liaison à l'ARN. La suppression de *Dnd* chez la souris entraîne une augmentation de la fréquence de l'apoptose des cellules germinales primordiales et de la formation de tératomes sur le fond génétique 129/SvJ (Youngren et al. 2005). La fonction moléculaire de *Dnd* est d'empêcher la fixation de micro-ARNs (miARN), protégeant les ARNm de la dégradation et par conséquent, autorisant la traduction (Kedde et al. 2007). Récemment une étude a montré que *Dnd* est capable de se fixer sur les ARNm de gènes de pluripotence (dont *Pou5fl*, *Sox2*, ...), de cycle cellulaire et d'apoptose. Ainsi en l'absence de *Dnd* tous ces gènes pourraient être la cible de mi-ARNs, induisant alors leur dégradation (R. Zhu et al. 2011).

La mort cellulaire dans la lignée germinale est contrôlée par des mécanismes à la fois positifs et négatifs qui maintiennent le nombre approprié de cellules germinales et empêchent la formation possible de tumeurs des cellules germinales. La protéine NANOS3 appartient à une famille très conservée au cours de l'évolution, Nanos homologue (protéine de liaison aux ARN), et est nécessaire pour la survie des cellules germinales primordiales (Tsuda et al. 2003). Chez la souris, *Nanos3* est exprimé dans les cellules germinales primordiales à partir de 7,5 *jpc* mais ne semble actif qu'à partir de 9,5 *jpc* lorsque les cellules migrent. Le modèle murin perte de fonction de *Nanos3* présente un phénotype de diminution drastique des cellules germinales primordiales à 12.5 *jpc*. Ce phénotype peut être restauré lorsque les souris sont

également déficientes pour le gène *Bcl-2-associated X (Bax)*. La protéine BAX appartient à la famille des protéines BCL-2, elle est impliquée dans la voie de signalisation pro-apoptotique (Burlacu 2003; Elmore 2007). En l'absence de *Nanos3*, les cellules germinales primordiales rentrent en apoptose par des voies d'apoptose dépendantes et indépendantes de la voie BAX (Suzuki et al. 2008).

Migration des cellules germinales primordiales

Au cours de l'embryogenèse, les cellules germinales primordiales spécifiées vers 7 *jpc* dans l'épiblaste doivent migrer dans l'embryon pour atteindre la crête génitale et remplir leur fonction dans la gonade (Richardson et Lehmann 2010). Les cellules germinales primordiales nécessitent un programme de motilité intrinsèque et de signaux de guidage externes pour survivre et réussir leur migration. A partir des années 1990, avec le développement des techniques de transgénèse et de microscopie, il a été établi qu'à 9,5 *jpc*, les cellules ont migré au niveau de l'intestin postérieur. Dans les jours qui suivent, elles migrent le long du mésentère de l'intestin vers les crêtes génitales à 10.5 *jpc* (P. P. L. Tam et Snow 1981). À 12.5 *jpc*, la grande majorité des cellules germinales primordiales ont colonisé les crêtes génitales (R. Anderson et al. 2000). Chez la souris, contrairement à d'autres organismes comme la drosophile ou le poisson zèbre, peu d'études décrivent les mécanismes d'initiation de la migration des cellules germinales qui restent obscurs (voir pour revue (Richardson et Lehmann 2010)).

Ainsi, vers 7,5 *jpc*, des observations avec des microscopes électroniques ont mis en évidence que les cellules germinales primordiales commencent à présenter une morphologie polarisée et à étendre les protrusions cytoplasmiques* à mesure qu'elles initient la migration à travers la ligne primitive dans l'endoderme embryonnaire postérieur (J. M. Clark et Eddy 1975). L'observation des protrusions cytoplasmiques favorise l'hypothèse d'une migration active des cellules germinales primordiales. La première observation *in vivo* et « en direct » de la migration des cellules germinales est réalisée en 2001 en utilisant un modèle murin où les cellules germinales expriment la eGFP. Cette étude de Molyneaux décrit pour la première fois en détails le trajet des cellules germinales primordiales de 9 à 11.5 *jpc* (Molyneaux et al. 2001).

Les mécanismes généraux impliqués dans la migration des cellules dans l'organisme sont basés sur un système d'attraction-répulsion.

Premièrement, les cellules qui vont migrer et les cellules présentes à la localisation finale vont favoriser la migration en sécrétant des molécules attractives : c'est la chimio-attraction. Les molécules attractives vont être perçues par les cellules migrantes et stimuler la formation des protrusions cellulaires polarisées. Les molécules attractives sont sécrétées d'une source immobile formant ainsi un gradient de concentration qui conduit à une migration directionnelle vers les niveaux les plus élevés de chimio-attractant. Chez la souris la première preuve d'un système d'attraction a été donnée en 1990 : des cellules germinales ont été isolées à 10.5 *jpc* à partir de mésentère de l'intestin et mises en culture sur des couches de cellules nourricières, en

présence de crêtes génitales et d'autres organes explantés. Les cellules germinales en culture vont migrer de préférence vers les crêtes génitales, suggérant que celles-ci sécrètent une substance attractive pour les cellules germinales exerçant des effets à long terme sur la population migrante de cellules germinales primordiales (Godin, Wylie, et Heasman 1990).

Parmi les molécules impliquées dans la chimio-attraction, on trouve des protéines transmembranaires telles que les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Les effecteurs de la voie de signalisation des petites GTPases entraînent la polarisation localisée des cellules en migration par des réarrangements cytosquelettiques. Par exemple, la chimiokine GPCR (motif CXC) du récepteur 4 (CXCR4) induit l'attraction de nombreux types de cellules, y compris les cellules germinales primordiales du poisson zèbre vers le facteur 1 dérivé du stroma (SDF-1) (Knaut et al. 2003).

Deuxièmement, les cellules en migration peuvent être repoussées directement par des chimio-répulsifs. Les cellules détectent les signaux répulsifs et les évitent. Ainsi ces signaux peuvent définir la direction de la migration et également réguler les gradients de chimio-attractant dans l'espace et le temps. La régulation des chimio-attractants par les chimio-repoussants peut se faire par séquestration du signal. En effet, chez le poisson zèbre, lors de la migration des cellules germinales primordiales, la protéine CXCR7b séquestre le SDF-1 par endocytose (Mahabaleshwar et al. 2008). Les effets combinés de ces divers régulateurs conduisent à la formation des voies migratoires observées au cours de l'embryogenèse (Treat, Chen, et Jacobson 2012) Comme chez le poisson zèbre, SDF-1 et CXCR4 sont exprimés chez la souris et participent en tant que système attractif pour les cellules primordiales germinales. SDF-1 est exprimé au niveau des crêtes génitales et du mésenchyme environnant, tandis que CXCR4 est exprimé par les cellules germinales primordiales. Les modèles murins perte de fonction de *Sdf-1* ou de *Cxcr4* présentent un phénotype où très peu de cellules germinales primordiales atteignent la crête génitale. De plus, l'expression ectopique du SDF-1 provoque la migration des cellules germinales primordiales vers de nouveaux emplacements (Molyneaux et al. 2003; Ara et al. 2003).

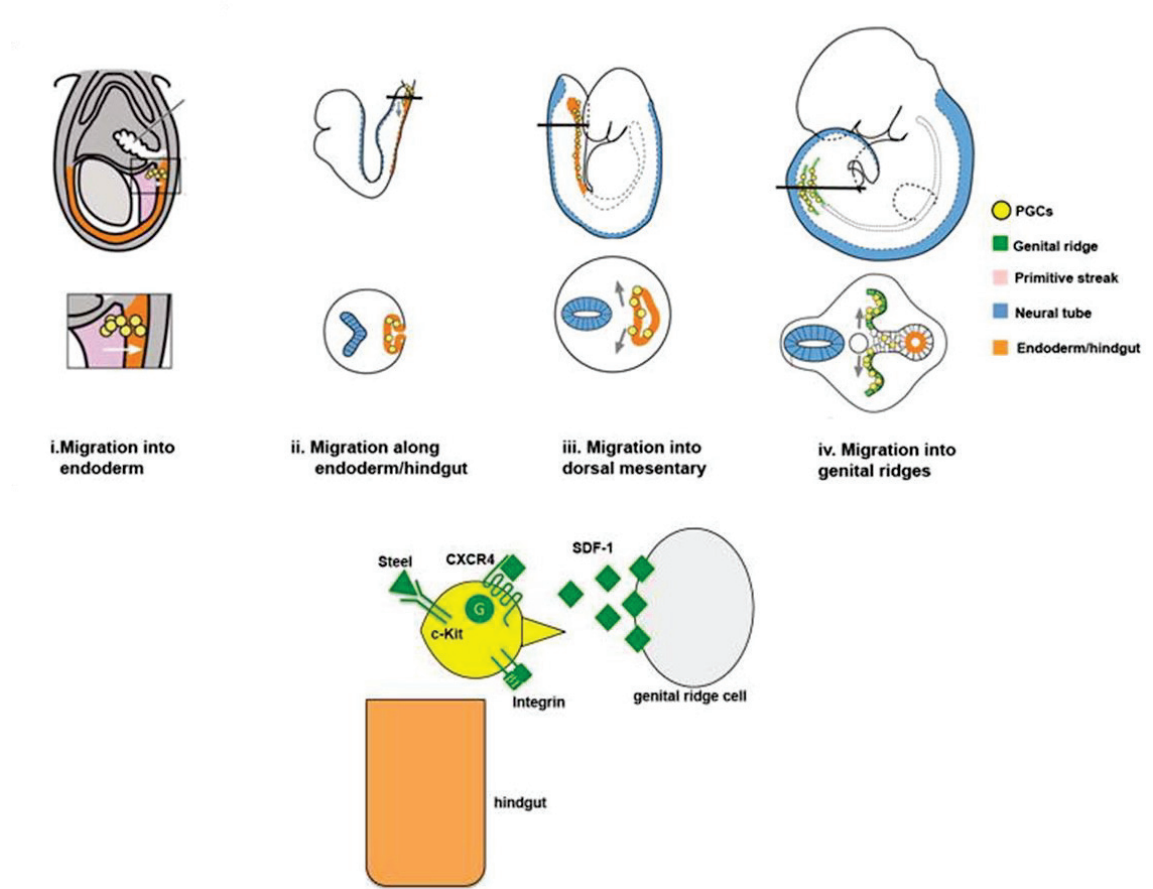
Enfin, comme chez la drosophile, on trouve chez la souris des acteurs de la voie de signalisation tyrosine kinase impliqués dans la migration des cellules germinales primordiales. Le *c-Kit Receptor Tyrosine Kinase (c-Kit RTK ou Kit)* et son ligand *Steel* sont nécessaires à la migration et la survie des cellules germinales primordiales. Les souris invalidées pour *Kit* ou *Steel* présentent des phénotypes à la naissance de gonades sans cellules germinales. Les cellules germinales ne migrent plus et sont retrouvées à l'extérieur de la gonade (McCoshen et McCallion 1975; Mahakali Zama, Hudson, et Bedell 2005). Les cellules germinales primordiales expriment la protéine KIT et migrent le long des cellules somatiques qui expriment la protéine STEEL. De plus, chez le modèle perte de fonction de *Steel*, les

cellules germinales migrent dans la bonne direction mais le taux de migration est considérablement réduit (Runyan et al. 2006). Ainsi, plutôt que de fournir un repère directionnel, Kit et Steel réguleraient la motilité générale des cellules germinales primordiales. Dans ces modèles, les cellules germinales primordiales qui présentent un défaut de migration rentrent en apoptose pour être éliminées (Molyneaux et al. 2001). L'élimination des cellules germinales primordiales qui ne migrent pas est un mécanisme nécessaire car la persistance de ces cellules ectopiques peut conduire à la formation des tumeurs des cellules germinales (D. T. Schneider et al. 2001).

Une fois que les cellules germinales primordiales atteignent la gonade à 10.5 *jpc*, elles cessent de migrer et s'associent aux cellules somatiques de la gonade. Elles vont ensuite se différencier en acquérant des caractéristiques spécifiques au sexe et commencent à remplir leurs fonctions et deviennent des cellules compétentes pour la gamétogenèse.

Il n'y aucune preuve scientifique de la perte de la motilité des cellules germinales, cependant elles ne migrent plus et resteront dans la gonade jusqu'à leur expulsion pour être fécondées. Il donc fort probable que les cellules germinales primordiales perdent la capacité de migration directionnelle non seulement car elles ont atteint leur destination finale, mais aussi parce que la motilité doit être supprimée pour que les gonades se forment correctement. L'hypothèse la plus rémanente est que les contacts cellule à cellule entre les cellules germinales primordiales et somatiques soient important pour ce processus (Richardson et Lehmann 2010).

Figure 2.5 : Migration des cellules germinales primordiales chez la souris



Issu de (Richardson et Lehmann 2010).

Reprogrammation épigénétique

La reprogrammation épigénétique consiste en un processus de remodelage de l'ADN qui efface ou applique des marques épigénétiques telles que des méthylations de l'ADN (Reik 2001). Les modifications épigénétiques des cellules germinales consistent en l'effacement de l'empreinte génomique, à la réactivation du chromosome X inactivé chez les femelles et à la déméthylation des éléments transposables/répétitifs, entraînant la création d'un génome épigénétiquement « inerte » avant 13.5 *jpc* (Monk, Boubelik, et Lehnert 1987; Kafri et al. 1992; Hajkova et al. 2002; J. Lee et al. 2002). Lors de la fécondation et la fusion de deux gamètes parentaux, l'embryon est composé des génomes paternel et maternel. Ces génomes portant une empreinte maternelle et paternelle doivent être reprogrammés lors de la gamétogenèse. Le maintien tout au long de la vie des marques de méthylation spécifiques aux parents est rare chez les mammifères (Proudhon et al. 2012). Ainsi le génome des cellules germinales va être déméthylé et reméthylé. Initialement, avant la spécification, les cellules germinales primordiales présentent un niveau de méthylation à l'échelle du génome similaire à celui de leurs cellules épiblastiques précurseurs (Guibert, Forne, et Weber 2012). Des analyses de méthylation du génome de séquences dinucléotidiques CpG à 13.5 *jpc* ont révélé une hypométhylation significative des cellules germinales primordiales mâles et femelles (Popp et al. 2010; Guibert, Forne, et Weber 2012). Cette reprogrammation est une condition liée à la pluripotence des cellules germinales qui permettra à l'embryon issu de ces nouvelles cellules germinales de développer tous les tissus de l'individu.

Chez les mammifères, les mécanismes de déméthylation active de l'ADN restent encore obscurs et leur étude est difficile (S. C. Wu et Zhang 2010).

Il existe des informations sur le mécanisme connu de la déméthylation de l'ADN impliquant les 5-méthylcytosine [5mC] déméthylases chez les plantes (voir pour revue (Gehring, Reik, et Henikoff 2009). D'autres mécanismes potentiels ont été proposés pour la déméthylation active de l'ADN chez les animaux, mais aucun n'a encore été démontré de manière convaincante comme responsable de la déméthylation de l'ADN à l'échelle du génome dans les cellules germinales primordiales (M. Saitou, Kagiwada, et Kurimoto 2012).

Parmi les mécanismes proposés, la *cytosine deaminase* AID est une 5-méthylcytosine désaminase conduisant au remplacement d'une cytosine par une thymine. Son action peut donc conduire à des mutations de transition C en T dans l'ADN méthylé créant du mésappariement T:G. Les mésappariements deviendraient alors la cible de mécanismes de réparation de l'ADN. Cependant, il est important de noter que Aid et Apobec1 sont exprimés à des niveaux très bas dans les cellules germinales primordiales (Hajkova et al. 2010) et que les souris *Aid*^{-/-} mâles et

femelles sont fertiles, les souris *Aid^{-/-}* étant maintenues pendant nombreuses générations par croisements entre homozygotes (Muramatsu et al. 2000), ce qui indique que l'AID joue un rôle faible, voire inexistant, dans le développement des cellules germinales (Morgan et al. 2004).

Des études récentes ont montré que les protéines TET (TET1, 2 et 3) sont de nouvelles ADN déméthylases candidates dans les cellules germinales primordiales, et plus particulièrement TET1 et TET2. Ces protéines déméthylent l'ADN en passant par les voies de réparation de l'ADN (Tahiliani et al. 2009; Hajkova et al. 2010; Y.-F. He et al. 2011; Pfaffeneder et al. 2011). Aucune étude à l'heure actuelle n'a pu donner de preuve convaincante d'une déméthylation active de l'ADN déclenchée par une enzyme dans les cellules germinales primordiales. Cependant, il est quasiment sûr que la déméthylation de l'ADN dans les cellules germinales primordiales est induite par un mécanisme de réparation de l'ADN (Hajkova et al. 2008; 2010). Ainsi, les cellules germinales primordiales à 11.5 *jpc* semblent subir une réorganisation globale de leur état chromatinien leur conférant une morphologie de leur noyau unique (très large avec des grappes de domaines d'hétérochromatine péricentriques de plusieurs chromosomes) et la perte concomitante du linker histone H1 (Probst et Almouzni 2011).

Chez l'individu XX, la composition chromosomique du double XX apporte un effet dose de celui-ci. Il est donc nécessaire d'en inactiver un, permettant ainsi une dose équivalente de X entre les mâles et les femelles. Les cellules germinales doivent cependant réaliser la méiose afin de fournir des gamètes haploïdes et il est donc nécessaire de réactiver le deuxième chromosome X chez les individus XX. Les modifications d'histones telles que H3K9me2/3 et la région *X inactivation center* (*Xic*) sont impliquées dans la régulation du processus de inactivation/réactivation du X. Le *Xic* est une région qui comprend plusieurs gènes codants ou non-codants comme le gène *X inactive specific transcript* (*Xist*). Ce gène est le premier gène non-codant découvert dans la région *Xic* et des mutations de son promoteur sont associées à des pathologies impliquant le maintien du deuxième chromosome X comme le syndrome de Lowe* (Cau et al. 2006).

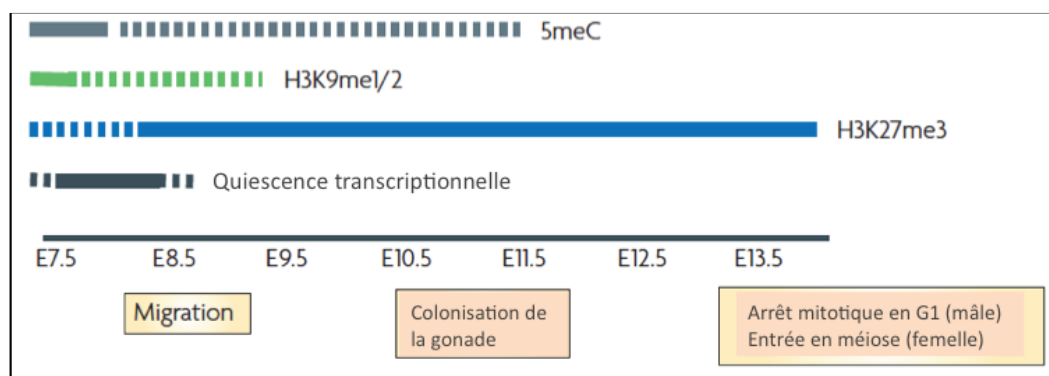
Les reprogrammations épigénétiques des cellules germinales commencent avec la spécification de celles-ci et se perpétuent après leur colonisation de la crête génitale (Seki et al. 2005; 2007).

Ainsi, la réalisation de la cartographie du génome suivant les modifications d'histones a pu mettre en évidence que de 7.75 à 8,75 *jpc*, l'expression de H3K9me2 (H3K9me2 : état diméthylé de l'histone H3 au niveau du résidu de lysine 9) est réduite dans les cellules germinales primordiales. A partir de 8,25 *jpc*, la H3K27me3 est régulée positivement (H3K27me3 : méthylation d'histone associée à la formation de région hétérochromatine). A 9,5

jpc, presque toutes les cellules germinales primordiales présentent une régulation positive de H3K27me3 (Guibert, Forne, et Weber 2012).

Cependant, les mécanismes en amont ou en aval de ces modifications d'histones restent peu compris et il serait intéressant d'identifier les séquences à partir desquelles H3K9me2 est retirée et auxquelles H3K27me3 est ajoutée pour fournir des informations essentielles et explorer le fonctionnement de ces événements. Récemment, l'étude *in vitro* des marques épigénétiques des cellules souches embryonnaires (ESC) a permis de mettre en avant que le contrôle des transposons serait également lié aux modifications des H3K27me3. Les transposons sont des séquences d'ADN capables de se mobiliser et de passer d'une position à une autre. H3K9me2 et H3K27me3 occupent différentes familles de transposons ou différents territoires au sein de la même famille, définissant trois catégories fonctionnelles de réponses adaptatives de la chromatine à la perte de méthylation de l'ADN. Ces résultats révèlent que dans les cellules souches embryonnaires lorsque la méthylation de l'ADN est progressivement perdue, les transposons sont réactivés au début, puis remis en mode silencieux par des mécanismes alternatifs. Ces mécanismes compensent la disparition de la méthylation de l'ADN en encourageant l'ADN situé autour des transposons à se compacter, ce qui empêche leur déplacement (Walter et al. 2016).

Figure 2.6 : Reprogrammation épigénétique des cellules germinales au cours de l'embryogenèse chez la souris



Issu de (Sasaki et Matsui 2008)

Enfin, les cellules germinales primordiales répriment le gène *DNA methyltransferase 3L (Dnmt3L)* peu de temps après leur spécification. *Dnmt3L* est un gène impliqué dans l'application de la méthylation de novo sur l'ADN (Barau et al. 2016). Il est réactivé chez le mâle lors de la quiescence des cellules germinales (Seki et al. 2005). Ainsi pendant la période de quiescence, les cellules germinales acquièrent des méthylations dites de novo soumises à empreinte paternelle*. Ces méthylations se mettent en place à partir de 14.5 jpc. Le gène *Dnmt3L*, exprimée dans les cellules germinales à partir de 14.5 jpc, est nécessaire

à l'apposition de ces empreintes paternelles dans les cellules germinales. Dans le modèle murin d'inactivation de *Dnmt3L*, les cellules germinales ne présentent pas sur leur génome l'apposition de groupe méthyle sur les cytosines de l'ADN. Ainsi *Dnmt3L* est impliqué dans les remaniements épigénétiques au cours de la période de quiescence des cellules germinales (Kato et al. 2007).

Licensing des cellules germinales : le passage de cellules germinales primordiales à cellules compétentes à la gamétogénèse

A partir de 11 *jpc* les cellules germinales primordiales acquièrent la capacité de se différencier sexuellement en cellules qui seront ensuite capables d'entrer en méiose, un processus appelé « Licensing ».

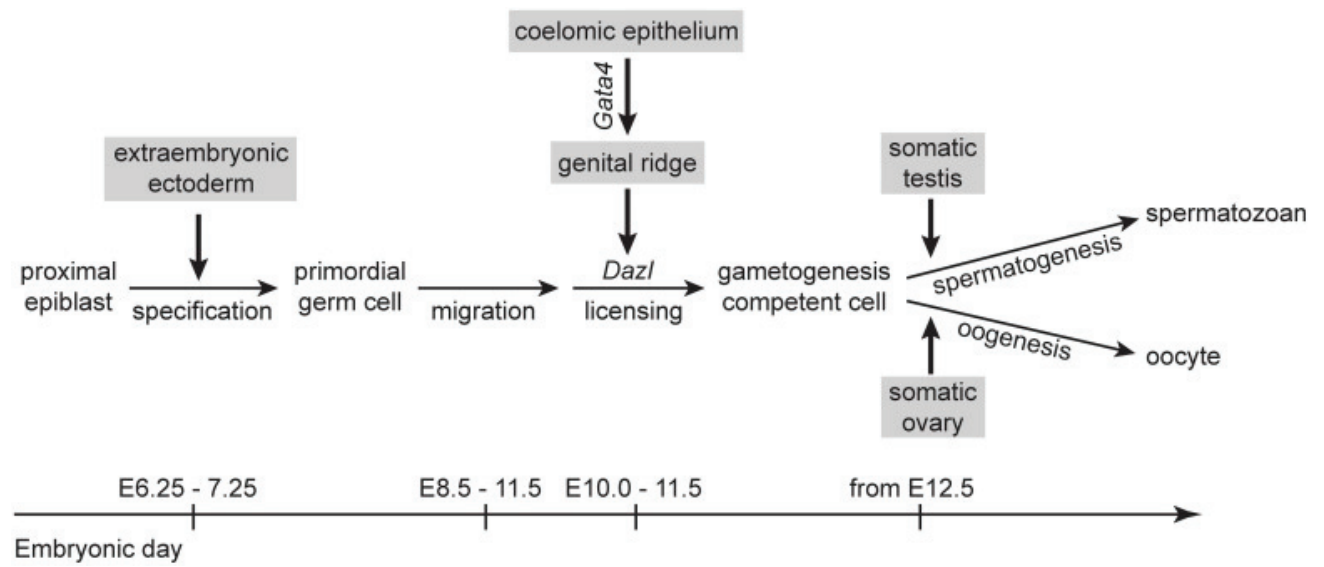
Le profil d'expression génique des cellules germinales primordiales change (Molyneaux et al. 2004; Mayère et al. 2019). Les cellules germinales primordiales activent un ensemble de gènes qui leur permettent de poursuivre la différenciation sexuelle et la gamétogénèse, et de désactiver leur programme de pluripotence. Après cette transition, les cellules germinales sont appelées cellules compétentes pour la gamétogénèse (GCC) ou gonocytes (McLaren et Southee 1997; Gill et al. 2011).

Chez la souris, à 11 *jpc* les cellules germinales primordiales expriment les marqueurs *Pou5f1*, *Sox2*, *Dppa3* et *Ssea-1*, comme décrit précédemment. Au cours du licensing, l'expression de ces marqueurs diminue progressivement jusqu'à disparaître à 13.5 *jpc*. Inversement à partir de 11 *jpc*, les cellules germinales vont se mettre à exprimer des marqueurs spécifiques de la lignée germinale tels que *Germ cell nuclear antigen 1 (Gcn1)*, un antigène nucléaire, *Tra98*, un autre antigène nucléaire (H. Tanaka et al. 1998), *Delated in azoospermia like (Dazl)* (Saunders et al. 2003), et le récepteur nucléaire orphelin *Estrogen related Receptor β (ERR β)* (Mitsunaga et al. 2004). Les cellules germinales acquièrent également l'expression du marqueur *Ddx4*, extrêmement conservé dans les cellules germinales des métazoaires.

La première hypothèse est que le mécanisme de licensing est intrinsèque aux cellules germinales. En effet, les cellules germinales primordiales qui ont subi un défaut de migration et sont restées le long du trajet migratoire au niveau de l'allantoïde, de la queue, de la ligne médiane, dans la moelle épinière et la glande surrénale, réalisent quand même le licensing et l'entrée en méiose (Zamboni et Upadhyay 1983; Stallock et al. 2003; Runyan et al. 2004). Cette hypothèse a été réfutée par l'observation que les cellules germinales ne se différencient pas dans les embryons de souris invalidés pour le gène *Gata4* qui ne développent pas de crête génitale (Hu et al. 2015).

A partir de 11 *jpc*, le gène *Gata4* exprimé par les cellules somatiques va induire l'expression de *Dazl*. Le gène *Dazl* est nécessaire au licensing des cellules germinales primordiales. Dans le modèle murin perte de fonction pour *Dazl*, les cellules germinales continuent à exprimer les marqueurs de pluripotence *Pou5f1*, *Nanog* et *Sox2*, ne se différencient pas et finissent par entrer en apoptose à 15.5 *jpc* (Gill et al. 2011).

Figure 2.7 : Modèle schématique du Licensing des cellules germinales



Issu de (Hu et al. 2015).

Les cellules germinales : détermination du sexe et entrée en méiose

Après le licensing, les gonocytes se différencient en ovogonies ou en prospermatogonies en fonction du sexe de l'embryon.

La détermination du sexe des cellules germinales dépend de signaux externes présents dans leur environnement plus que du sexe chromosomique des cellules germinales elles-mêmes. En effet les cellules germinales XY peuvent se développer sous forme d'ovocytes dans des embryons chimériques XX (S. J. Palmer et Burgoyne 1991a; 1991b). Il semble que la différenciation en fonction du sexe des cellules germinales intervienne aux environs de 11.5 – 12.5 *jpc* (Dokshin et al. 2013; Mayère et al. 2019)

L'engagement des cellules germinales mâles

Chez la souris XY, la prolifération des cellules germinales ralentit progressivement à partir de 12.5 *jpc* puis va s'arrêter à 13.5 *jpc* en phase du cycle cellulaire G0/G1 (Vergouwen et al. 1991). L'arrêt mitotique des cellules souches est régulé par un mécanisme du cycle cellulaire très conservé et dont les acteurs sont exprimés dans les cellules germinales mâles (Western et al. 2008; Terzi, Izmirli, et Gogebakan 2016).

Ce mécanisme consiste à réguler l'état de phosphorylation de la protéine Retinoblastoma 1 (RB1) qui va réguler en retour le point de contrôle G1/S. Le gène *Rb1* régule et inhibe le cycle cellulaire. En effet, la protéine RB1 phosphorylée va se fixer au facteur de transcription E2F, ce qui va inhiber la transcription des gènes du cycle cellulaire tels que *Cycline E et A*, *Cyclin dependent kinase 2 (Cdk2)*, de gènes impliqués dans les étapes précoces de la réplication de l'ADN comme *Cell division cycle 6 (Cdc6)*, et de gènes codant pour les protéines du complexe MCM (Minichromosome maintenance complex) (Dalton et Coverdell 2015; Terzi, Izmirli, et Gogebakan 2016).

A partir de 12.5 *jpc*, les pro-spermatogonies commencent à exprimer progressivement des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que les membres de la famille cyclin-dependent kinase inhibitors (INK4, p15 et p16) et les CDK interacting protein/Kinase inhibitory proteins (CIP/KIP, p21, p27 et p57). Ces deux familles d'inhibiteurs inhibent la formation des complexes Cdk/cyclines (Beumer et al. 1999; Western et al. 2008).

Ensuite, les cellules germinales mâles après l'arrêt en G0-G1 se mettent à exprimer le gène *Nanos2*, un marqueur spécifique de la lignée germinales mâle. Les cellules germinales invalidées pour *Nanos2* ne parviennent pas à maintenir cet état G0 et à reprendre l'activité

mitotique après la naissance. Les effets de NANOS2 ne se limitent pas à la suppression de la méiose, car ils favorisent également l'expression génique de type mâle (Saba, Kato, et Saga 2014). Les gonocytes mâles au cours de la période de quiescence expriment également spécifiquement le gène *Dnmt3L* impliqué dans la reprogrammation épigénétique (Barau et al. 2016).

L'engagement des cellules germinales femelles

Chez la souris XX, l'engagement dans la voie de l'ovogenèse a longtemps été considéré comme étant l'entrée en méiose des cellules germinales à 13.5 *jpc* avec l'expression du marqueur *Stimulated par retinoic acid 8 (Stra8)*. Dans les souris XX invalidées pour le gène *Stra8*, les gonocytes n'initient pas la méiose mais ont adopté un destin femelle. Ces gonocytes se différencient en des cellules ressemblant à des ovocytes qui synthétisent des zonae pellucidae, organisent les cellules somatiques environnantes en follicules et qui sont ovulées en réponse à une stimulation hormonale (Dokshin et al. 2013). Le manque de marqueurs spécifiques des ovogonies ne permet pas à ce jour d'étudier l'engagement de la voie de l'ovogenèse avant 13.5 *jpc*. Une récente étude de Single Cell Sequencing a décrypté le transcriptome des cellules germinales de 10.5 à 16.5 *jpc*, ce qui va permettre d'identifier des marqueurs spécifiques des ovogonies (Mayère et al. 2019).

Hypothèses historiques sur l'initiation de la méiose

La différence majeure concernant la méiose des gonocytes XX et XY est la période au cours de laquelle ils effectuent ce processus. Les cellules germinales des gonades XY entrent en quiescence entre 11.5 et 12.5 *jpc* (McLaren et Southee 1997; Chuma et Nakatsuji 2001; Adams et McLaren 2002). Après la naissance, ces cellules vont reprendre la prolifération et se différencier en cellules souches spermatogoniales, qui vont à leur tour se différencier en spermatogonies puis entrer en méiose en vagues de spermatogenèse. Dans l'ovaire foetal, les ovogonies initient la méiose à 13.5 *jpc* et traversent les différents stades de la prophase méiotique avant la naissance, puis sont arrêtées en diplotène jusqu'à l'âge adulte (Pour revue voir (Kocer et al. 2009)).

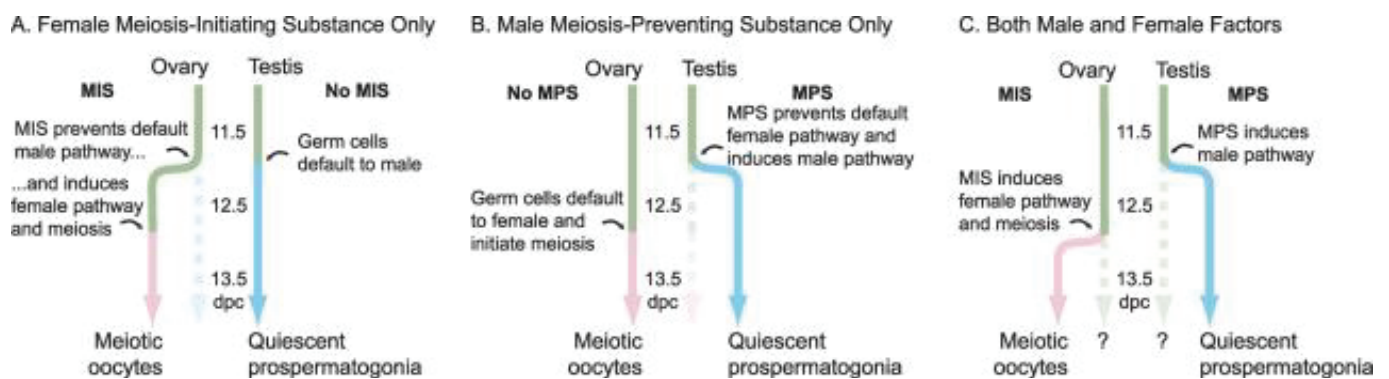
En 1977, Evans et collègues ont observé que les cellules germinales n'entraient pas en méiose en raison de leurs propriétés intrinsèques telles que le nombre de divisions cellulaires, mais plutôt sous l'influence d'un signal produit par les cellules somatiques environnantes (E. P. Evans, Ford, et Lyon 1977). Ces travaux ont amené le concept de l'existence d'une molécule induisant la méiose (Meiosis-Inducing Substance ou MIS), présente dans l'ovaire foetal aux

alentours de 13.5 *jpc*. En 1991, Palmer et Burgoyne confirme l'hypothèse que l'environnement somatique induit le destin des cellules germinales, en mettant en culture des gonocytes XY isolés, soit sur agrégats pulmonaires ou sur des crêtes génitales d'individus XX ou XY (S. J. Palmer et Burgoyne 1991a; 1991b). Les gonocytes XY à 11.5 *jpc* placés en culture dans un environnement XX vont initier la méiose, ce qui suggère que les gonocytes ont reçu un signal provenant de l'environnement somatique pour initier la méiose. Des gonocytes XX placés dans un environnement XY vont rentrer dans un état quiescence.

Cependant, alors que des cellules germinales XY mises en culture à 11.5 *jpc* avec un environnement XX peuvent être induites et entrer en méiose, à 12.5 *jpc* elles ont déjà réagi à l'environnement XY et les placer en culture avec un environnement XX ne modifiera pas leur devenir. De plus, les cellules germinales XX placées en culture à 12.5 *jpc* XX avec un environnement somatique XY peuvent être induites et entrer en état de quiescence, tandis qu'un jour plus tard, à 13.5 *jpc*, les cellules germinales se différencient en ovogonies méiotiques dans ces conditions (Adams et McLaren 2002).

Ces résultats ont ainsi favorisé l'hypothèse de l'existence du Meiosis-Preventing Substance (MPS) sécrété par les cellules somatiques du testicule et agissant à courte distance, et de celle d'une substance somatique, diffusible, induisant la méiose, le Meiosis-Inducing Substance (MIS). Cette substance ne serait exprimée que dans l'ovaire foetal et non dans le testicule (Kocer et al. 2009).

Figure 2.8 : Mécanismes potentiels pour l'initiation de la méiose des gonocytes



Issu de (Kocer et al. 2009).

En 2006, l'acide rétinoïque (*All-Trans* Retinoic Acid ou ATRA) a été proposé comme étant le MIS capable d'induire l'initiation de la méiose dans les cellules germinales de l'ovaire foetal (Bowles et al. 2006; Koubova et al. 2006).

L'acide rétinoïque dérive de la vitamine A (rétinol). Le rétinol est essentiel au développement embryonnaire, à l'organogenèse et à l'homéostasie de la plupart des tissus et

cette voie régule de grandes fonctions physiologiques telles que la vision, l'immunité, la reproduction (Zile 2001). En effet, une carence en rétinol entraîne chez les mammifères un retard de croissance néonatal et un large éventail de malformations congénitales (Clagett-Dame et DeLuca 2002). La seule source de rétinol dans l'organisme est d'origine alimentaire. Le rétinol pour être actif doit être converti en composés actifs tels que l'acide rétinoïque (ATRA) (Blomhoff 1994). Ensuite, dans les cellules et les tissus, les niveaux d'acide rétinoïque doivent être contrôlés par un équilibre entre synthèse et catabolisme.

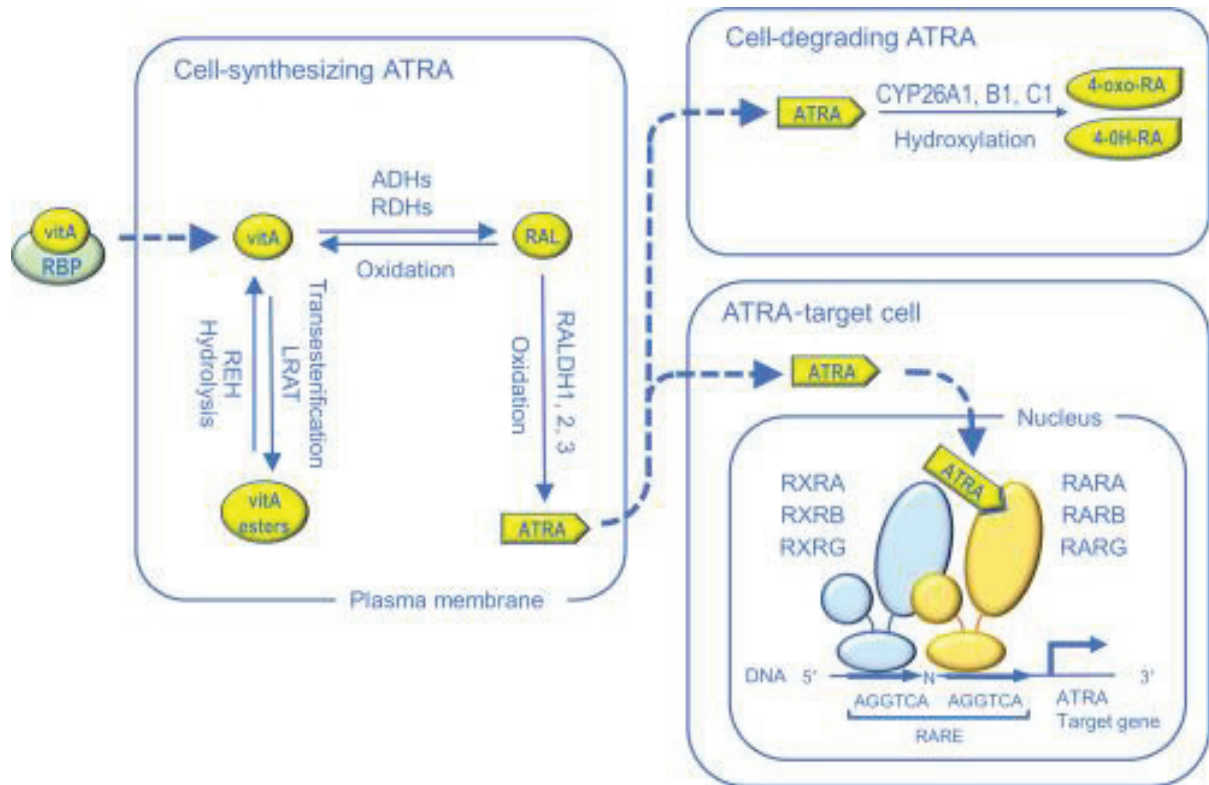
Le rétinol est converti en ATRA via deux étapes d'oxydation séquentielles. La première oxydation est catalysée par de l'alcool déshydrogénase cytosolique ou des rétinol déshydrogénases microsomiales (RDH), qui génèrent le rétinaldéhyde (RAL). Ensuite à partir du RAL, les RAL déshydrogénases (ALDH1A1, ALDH1A2 et ALDH1A3, codées par les gènes *Aldh1a1*, *Aldh1a2* et *Aldh1a3*, respectivement) vont catalyser le RAL en ATRA.

L'ATRA nouvellement synthétisé est une molécule liposoluble qui provient du milieu extracellulaire et diffuse à travers la membrane. Dans le cytoplasme, l'ATRA se lie aux protéines de liaison CRABP-I et CRABP-II, et entre dans le noyau (Delva et al. 1999; Budhu et Noy 2002).

Dans le noyau, l'ATRA contrôle l'expression de ses gènes cibles par l'activation de récepteurs nucléaires spécifiques, les Retinoic Acid Receptors ($RAR\alpha/\beta/\gamma$) et les Retinoid X Receptors ($RXR\alpha/\beta/\gamma$) (Chambon 1996; Germain et al. 2006a; 2006b). Ces récepteurs fonctionnent généralement sous forme d'hétérodimères par la liaison sur l'ADN à des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) situés dans des régions de régulation génomique.

Les cellules, selon le contexte physiologique, peuvent se protéger de la signalisation de l'ATRA en dégradant celui-ci. La dégradation est catalysée par trois enzymes *hydroxylases du cytochrome P450* (CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1), qui hydroxylent l'ATRA en produits hydrosolubles moins actifs et facilement excrétables (Samarut et Rochette-Egly 2012).

Figure 2.9 : Régulation de l'ATRA, Biosynthèse et Dégradation



Issu de (Teletin et al. 2017).

La signalisation de l'ATRA agit souvent de manière paracrine sur les cellules voisines, mais il existe également des preuves d'effets autocrines sur les cellules qui le synthétisent (Teletin et al. 2017).

L'acide rétinoïque, le MIS dans l'ovaire ?

Les travaux des équipes de Peter Koopman et de David Page en 2006 (Bowles et al. 2006; Koubova et al. 2006) ont fortement contribué au dogme selon lequel l'ATRA agit comme un MIS (Griswold et al. 2012). Ces études sont basées sur l'utilisation de modèles *ex vivo* et l'administration d'ATRA, d'antagonistes ou d'agonistes pharmacologiques de l'ATRA. Chez la souris, un modèle rapporteur de l'activité de l'ATRA a été généré par transgénèse : *RARE-hsp90-LacZ* (Rossant et al. 1991) et son étude a montré que l'activité de l'ATRA est faible dans les gonades, mais robuste dans le mésonephros des deux sexes (Bowles et al. 2006; Koubova et al. 2006). De plus, l'enzyme de synthèse de l'ATRA, ALDH1A2, et son ARN messenger *Aldh1a2* sont détectés également dans le mésonephros et la gonade des deux sexes de 11.5 à 13.5 *jpc*. Cela suggère que l'ATRA nécessaire à l'initiation de la méiose proviendrait du mésonephros.

Des études menées sur des cultures de gonades *ex vivo* ont montré que l'expression de *Stra8* dans les pré-ovogonies peut être inhibée en présence d'un agoniste inverse de la voie de signalisation de l'ATRA (BMS-204493) (Koubova et al. 2006). Inversement, l'exposition à des niveaux supra-physiologiques d'ATRA stimule l'expression de *Stra8* dans les cultures de gonades XY de souris (Baltus et al. 2006; Bowles et al. 2006; Koubova et al. 2006), d'homme (Le Bouffant et al. 2010) et d'amphibiens (Piprek et al. 2013; Wallacides et al. 2009). La protéine STRA8 est une protéine spécifique des vertébrés de 45 kDa (Oulad-Abdelghani 1996). Le gène *Stra8* est sous le contrôle d'un promoteur qui contient un RARE, qui se lie aux hétérodimères RAR/RXR. Il est un gène cible possible de l'ATRA (Oulad-Abdelghani 1996). L'inactivation du gène *Stra8* chez la souris a mis en évidence que STRA8 est nécessaire à l'initiation de la méiose en intervenant par un mécanisme encore non élucidé dans la duplication de l'ADN précédant l'entrée en méiose (Baltus et al. 2006; M. Mark et al. 2008; E. L. Anderson et al. 2008).

La notion de l'ATRA inducteur de la méiose est très débattue depuis quelques années avec l'analyse phénotypique de modèles de souris déficientes en enzymes de synthèse de l'ATRA (S. Kumar et al. 2011), ainsi que les travaux réalisés dans notre équipe (Chassot et al. 2020, en révision) en Annexe 2) et dans celle de Norbert Ghyselinck, IGBMC, (Vernet et al. 2019) en révision). En effet, l'analyse du modèle murin perte de fonction pour ALDH1A2 seule ou pour ALDH1A2 et ALDH1A3 montre que, bien que l'activité LacZ du rapporteur *RARE-hsp90* soit totalement éliminée, les cellules germinales expriment toujours *Stra8*, indiquant qu'elles initient la méiose normalement en l'absence d'ATRA (S. Kumar et al. 2011).

Néanmoins, il est possible que la synthèse de l'ATRA soit assurée par la troisième enzyme ALDH1A1. Les souris invalidées pour *Aldh1a1* sont viables et fertiles (Fan et al. 2003). De plus, ALDH1A1 est l'enzyme qui présente la plus faible affinité pour le RAL, et elle est donc moins efficace que ALDH1A2 pour la production d'ATRA (Gagnon et al. 2002). *Aldh1a1*/ALDH1A1 est exprimé dans les cellules somatiques en contact direct avec les cellules germinales. Dans le mutant perte de fonction de *Aldh1a1*, la méiose est retardée de 24 heures (Bowles et al. 2016).

Il restait donc à réaliser l'analyse du modèle murin triple mutant pour les gènes *Aldh1a1-3* qui fait l'objet de l'article présenté en Annexe 2 :

Chassot AA, Le Rolle M, Stevant I, Da Silva F, Nef S, Sched A, Ghyselinck NB and Chaboissier MC : « Retinoic Acid signalling is dispensable for meiosis initiation in female mice ». En révision.

CYP26B1, le MPS dans le testicule ?

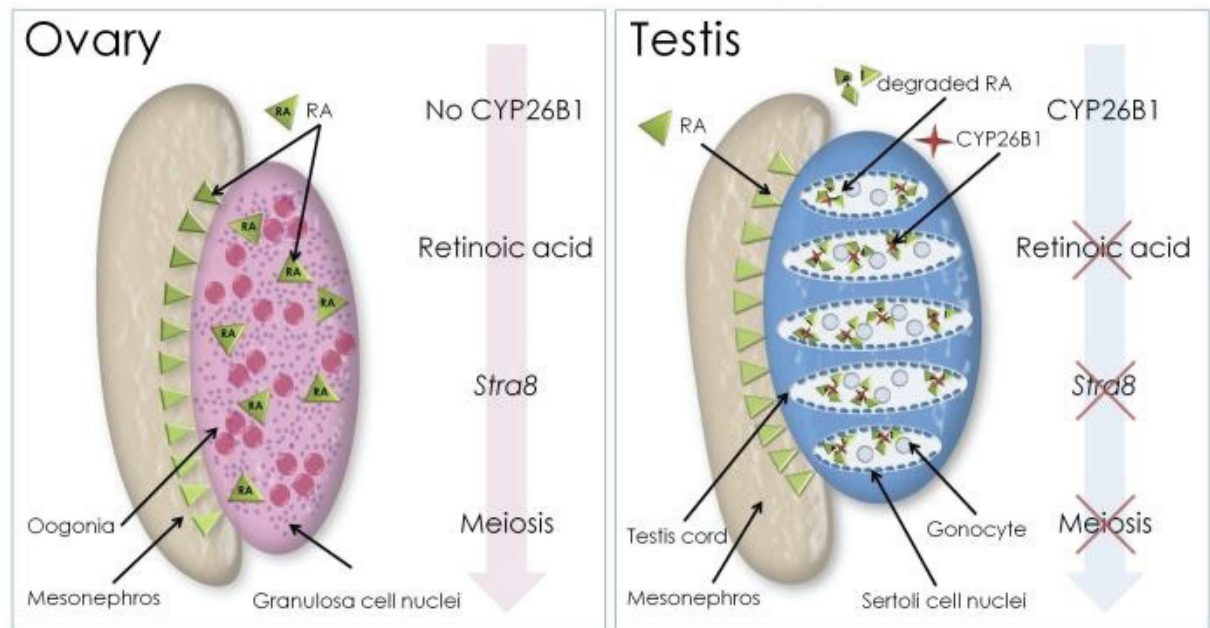
L'enzyme de dégradation de l'ATRA, CYP26B1 est exprimée dans les gonades embryonnaires XX et XY à 11.5 *jpc* mais son expression devient spécifique des gonades XY à 12.5 *jpc* dans les cellules somatique du testicule (Bowles et al. 2006).

Chez la souris, des études pharmacologiques *ex vivo* ont montré que dans les gonades XY mises en culture et exposées à des doses (non physiologiques) d'ATRA exogène ou au kétoconazole (un inhibiteur des CYP), les cellules germinales entrent en méiose et expriment alors des marqueurs méiotiques tels que *Stra8*, *DNA Meiotic Recombinase 1 (Dmc1* qui code pour une recombinaison méiotique) et *Synaptonemal Complex Protein 3 (Sycp3* codant pour une protéine du complexe synaptonémal) (Bowles et al. 2006).

De plus, l'administration simultanée de kétoconazole et d'un agoniste inverse des RARs, le BMS-204493, empêche ces événements méiotiques. Ces résultats suggèrent que le kétoconazole, bien que non spécifique de CYP26B1, est capable d'induire la méiose dans le testicule via les RARs (Koubova et al. 2006).

De plus, dans les souris perte de fonction de *Cyp26b1*, les cellules germinales se mettent à exprimer *Sycp3* à 13.5 *jpc* (MacLean et al. 2007). CYP26B1 a un rôle protecteur contre l'apoptose des cellules germinales car en l'absence de celui-ci les cellules germinales à 15.5 *jpc* rentrent en apoptose massive. Globalement, ces résultats sont compatibles avec la possibilité que le CYP26B1 représente ou synthétise le MPS. De manière intéressante, Kumar et collègues proposent que le CYP26B1 pourrait métaboliser un substrat distinct de l'ATRA (S. Kumar et al. 2011).

Figure 2.10 : Modèle schématique de la théorie du MIS et du MSP



Issu de (Griswold et al. 2012).

La plupart des études établissant le dogme de l'ATRA comme inducteur de la méiose sont menées *in vitro* ou *ex vivo* et il a été souligné de manière récurrente que les altérations du développement générées par l'ATRA *in vitro* ne reflètent pas nécessairement les processus physiologiques fonctionnant *in vivo* (Horton et Maden 1995; Manuel Mark, Ghyselinck, et Chambon 2006).

Cependant, ni l'expression de *Stra8*, ni la stimulation de l'expression des marqueurs méiotiques ne sont synonymes d'entrée dans la méiose (E. Evans et al. 2014; Manuel Mark et al. 2015).

Enfin, des études biochimiques ont mis en évidence de la diminution de l'expression de *Stra8* par l'antagoniste BMS-204493 ne reflète pas nécessairement une altération de son induction par des RAR activés par l'ATRA. En effet, le BMS-204493 est un agoniste inverse, un rétinoïde synthétique qui stabilise les interactions entre les complexes entre corépresseurs et RARs, qu'ils soient liés naturellement ou non à l'ATRA. Ainsi le BMS-204493, en fixant l'histone désacétylase associée aux corépresseurs, peut diminuer ou éteindre l'activité des gènes contenant un RARE mais pas nécessairement activés par les RAR activés par l'ATRA endogène (Germain et al. 2009).

En résumé, si la participation de *Stra8* dans l'initiation de la méiose est incontestable, en revanche le contrôle de son expression par l'ATRA endogène dans les cellules germinales reste plus controversé.

D'autres facteurs ?

La voie de signalisation de l'ATRA n'est pas la seule voie de signalisation qui a été proposée pour stimuler l'entrée en méiose des cellules germinales. En effet, différentes études *in vivo* basées sur des modèles murins d'inactivation de gènes ont décrit des phénotypes où l'expression de *Stra8* est dérégulée.

Ainsi, le facteur de transcription DMRT1, connu pour son rôle d'antagoniste de la voie de la différenciation femelle chez l'adulte afin de maintenir le phénotype des cellules de Sertoli, est également capable de se lier au promoteur de *Stra8*. Le modèle murin perte de fonction de *Dmrt1* dans l'ovaire fœtal présente une diminution du nombre de cellules germinales qui expriment *Stra8*, qui présentent un défaut de mise en place de la prophase I de la méiose à 13.5 *jpc*. Cependant, les souris femelle *Dmrt1*^{-/-} adultes sont fertiles malgré un nombre réduit de follicules. Ces résultats suggèrent que DMRT1 n'est pas suffisant pour induire l'entrée en méiose des cellules germinales (Krentz et al. 2011).

Les gènes à homeodomaine comme la famille des gènes *Muscle-segment homeobox* (*Msx*) sont également des régulateurs de la transition mitose/méiose. Les gènes *Msx1* et *Msx2* sont spécifiquement exprimés dans les ovogonies au cours du développement. L'inactivation chez la souris de *Msx1* et *Msx2* entraîne une diminution de l'expression des gènes de méiose comme *Stra8*, *Sycp3* et γ H2AX (*γ H2A Histone Family Member X*) à 13.5 et 14.5 *jpc*, indiquant que les cellules germinales n'ont pas initié la méiose, restent bloquées à l'état indifférencié (exprimant SSEA-1) puis finissent par mourir par apoptose (Le Bouffant et al. 2011).

Enfin, l'inactivation complète chez la souris XX de *Rspo1*, un activateur de la voie de signalisation WNT/ β -catenin (voir chapitre 4 : La voie WNT/ β -catenin dans l'ovaire en développement), entraîne une diminution de l'expression de *Stra8* et une entrée en quiescence d'une grande proportion des cellules germinales. Cependant, cet effet pourrait être indirect en raison de l'inversion de sexe observée dans les cellules somatiques de la gonade mutante.

Des gonocytes, aux gamètes, à la fécondation

La méiose, généralités

La méiose est le processus qui permet de réduire le nombre de chromosomes dans les gamètes afin que ces cellules passent du stade diploïde à haploïde. Ce processus a été découvert par Edouard Van Beneden en 1883 (Van Beneden 1883) chez le modèle *Asteria glacialis* (l'étoile de mer) puis confirmé dans un autre modèle de nématode, *Ascaris megalocephala*. La méiose sera ensuite décrite en 1901 chez les mammifères par Hans de Winiwarter. Les études de Hans de Winiwarter confirmeront que la méiose est un processus conservé au cours de l'évolution. De plus, il précisera les différentes étapes de la méiose et introduira les termes : leptotène, zygotène, pachytène et diplotène. Les gonocytes qui ont initié la méiose sont alors appelés des méiocytes.

Au cours de la méiose, les méiocytes procèdent à deux divisions cellulaires :

- 1) la division réductionnelle,
- 2) la division équationnelle.

La division réductionnelle permet aux gonocytes de passer de cellules diploïdes ($2n$) à 2 chromatides à deux cellules haploïdes (n) à deux chromatides. Cette division est découpée en quatre étapes.

La prophase I : la chromatine se condense et forme les chromosomes préalablement répliqués lors de l'interphase. Les chromosomes vont s'apparier par paires de chromosomes homologues ($2n$). Cette phase est divisée par cinq états caractéristiques de la chromatine : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. C'est au cours des stades zygotène et pachytène que l'on observe des phénomènes d'enjambement chromosomique (crossing over) qui vont permettre un processus de brassage intrachromosomique (pour revue voir (Baudat, Imai, et de Massy 2013)).

La prométaphase I : Les microtubules se lient aux chromosomes par les kinétochores au niveau du centromère.

La métaphase I : Les paires de chromosome homologues se placent de part et d'autre du plan équatorial de la cellule. Ils sont alignés et localisés par les microtubules de manière aléatoire, c'est la « ségrégation aléatoire ».

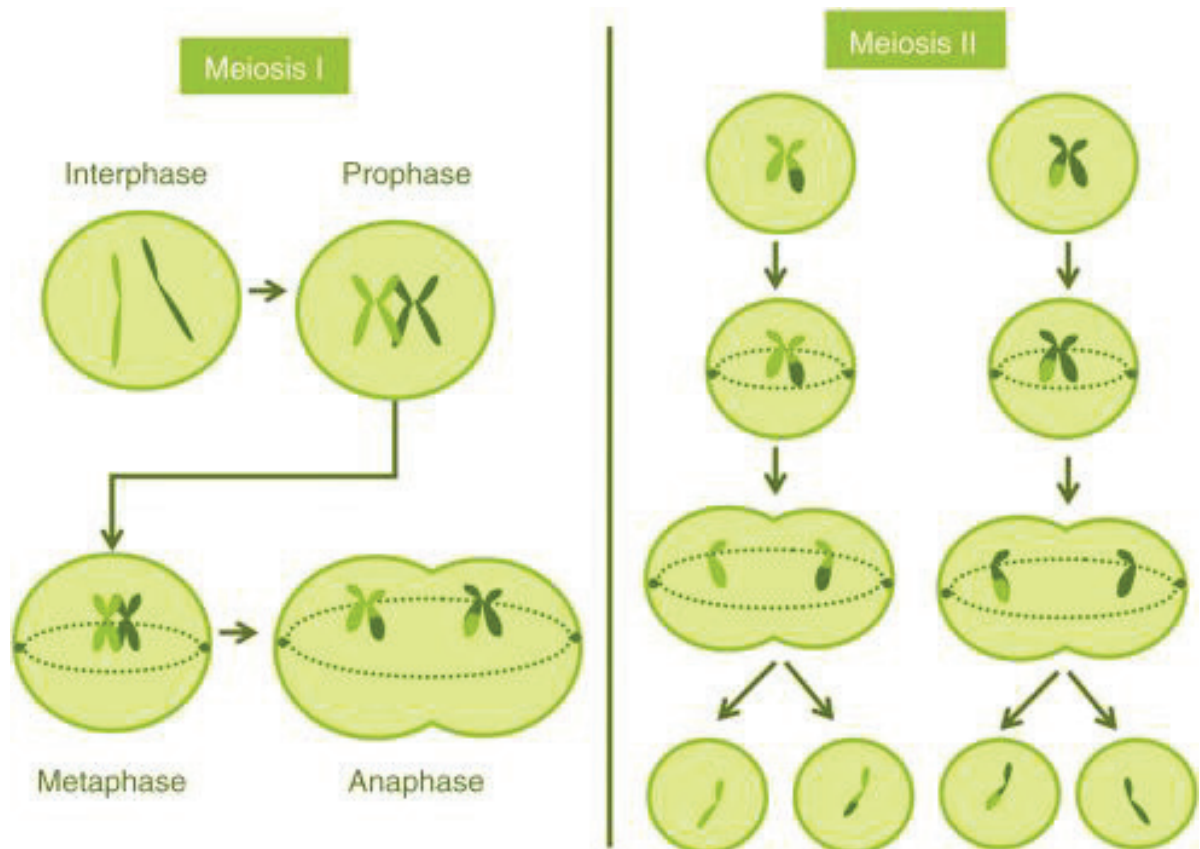
L'anaphase I : les chromosomes homologues reliés entre eux vont ensuite migrer vers un pôle de la cellule et s'éloigner de leur homologue. Les paires de chromosomes homologues ont la possibilité de migrer vers un des deux pôles selon leur agencement sur la

plaque équatoriale, impliquant différentes combinaisons possibles de cellules filles. Ce nouveau brassage chromosomique est le brassage interchromosomique.

La télophase I et cytotédièrese : les cellules vont se cliver en deux par cytotédièrese après avoir reformé leurs enveloppes nucléaires.

Enfin, après une période de latence, les méiocytes vont compléter la méiose en réalisant la division équationnelle. Les méiocytes ne réalisent pas de phase S (réplication de la chromatine) intermédiaire et réalisent une simple division de mitose. L'étape de prophase II n'existe pas. La division équationnelle commence par la prométaphase II et elle est ensuite également découpée en trois étapes, une métaphase II, une anaphase II et une télophase II, comme lors de la mitose (pour plus de détails sur ces mécanismes, voir (Korf 2017; Sanders et Jones 2018).

Figure 2.11 : Généralités sur la méiose



La spermatogénèse, généralités

La spermatogénèse peut être divisée en trois grandes étapes :

- La prolifération des spermatogonies afin d'assurer le maintien du stock de gamètes tout au long de la vie.
- L'entrée en méiose des spermatogonies.
- La spermiogénèse, afin de conférer aux spermatozoïdes leur morphologie (flagelle et acrosome).

Chez la souris mâle, à 13.5 *jpg* les cellules germinales sont entrées dans un état quiescent jusqu'à la naissance. Après la naissance, les tubes séminifères ne sont composés que par les cellules de Sertoli et les pro-spermatogonies quiescentes. La première vague de spermatogénèse synchrone va s'établir lors de la puberté afin de former le stock de spermatogonies qui sera ainsi prêt pour les vagues suivantes de spermatogénèse (Kluin, Kramer, et Rooij 1982).

Dans les deux premiers jours suivant la naissance chez la souris, les pro-spermatogonies vont se différencier en cellules souches spermatogoniales (CSS ou spermatogonies As) (Yoshida 2006). Au cours de la différenciation en CSS, des changements épigénétiques importants vont permettre dans un premier temps la reprise de la prolifération des CSS afin de maintenir un stock de cellules souches spermatogoniales. Chez la souris, les As commencent à s'auto renouveler à partir du 7^{ème} jour après la naissance (Kubo et al. 2015). Dans un deuxième temps, les cellules souches spermatogoniales vont initier la méiose (Shirakawa et al. 2013).

Les cellules de Sertoli orchestrent l'initiation de la première vague de spermatogénèse via la sécrétion de facteurs comme l'ATRA et via l'activation de la voie Notch (Raverdeau et al. 2012; Garcia et al. 2013; Busada et Geyer 2016).

Les spermatogoniales A single (As) forment le stock de cellule souches spermatogoniales. Elles se localisent près de la membrane basale des tubules et se divisent par mitose. Les cellules filles obtenues par mitose sont nommées Spermatogonies A paired (Apr) et ensuite Spermatogonies A aligned (Aal4 et Aal8-16 selon le nombre de mitose). Ce groupe de spermatogonies indifférenciées est également appelé "Transit amplifying progenitor cells" (Griswold 2016).

Les spermatogonies Aal vont ensuite se différencier en « Spermatogonies différenciées » de type A, qui comprennent 4 types différents A1, A2, A3 et A4. Différentes mitoses vont donner les spermatogonies différenciées intermédiaires (In) et (iv). Enfin, les spermatogonies vont initier la méiose et se différencier en « Spermatogonies différenciées » de type B (Griswold 2016). Ayant achevé la première division méiotique, ces cellules donnent naissance à des

cellules filles appelées spermatocytes secondaires, qui se divisent en une méiose complète pour former des spermatides arrondies (Hess et de Franca 2009).

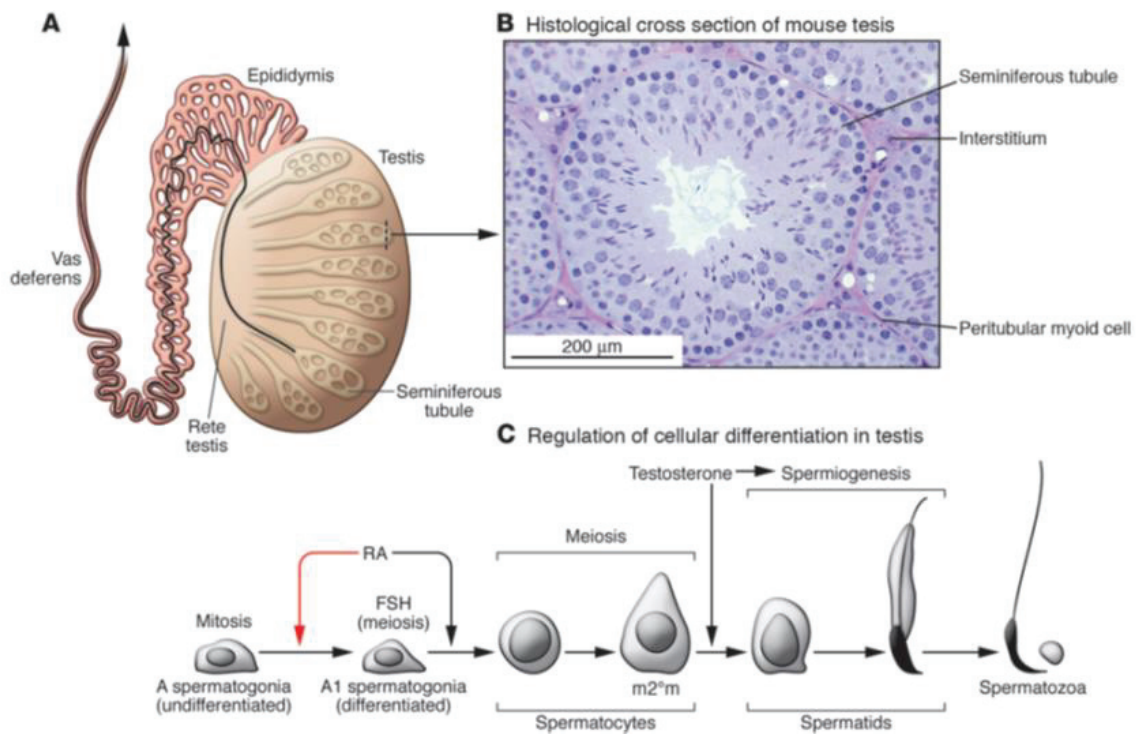
Les spermatides rondes subissent ensuite une métamorphose complexe, appelée spermiogénèse, pour devenir des spermatozoïdes libérés dans la lumière du tube séminifère par un processus appelé spermiation. Les cellules de Sertoli participent à ce processus de maturation des spermatozoïdes. A ce stade, les cellules de Sertoli vont permettre l'acheminement des spermatides vers la lumière du tube séminifères via un réseau d'actine et de microtubules (Su, Mruk, et Cheng 2013; Tang, Lee, et Cheng 2016).

Les spermatides rondes vont s'allonger et former l'acrosome. L'acrosome est une vésicule accolée au noyau par l'action de structures d'actine. Le noyau obtient alors sa forme allongée caractéristique des spermatozoïdes (Hess et de Franca 2009). L'acrosome est essentiel à la fécondation car il contient les enzymes hydrolytiques qui seront sécrétées et serviront au passage de la zone pellucide de l'ovaire (Jan et al. 2012). Après la formation de l'acrosome, les noyaux des spermatides vont se condenser autour des histones. Les histones vont être remplacées par des protamines qui vont augmenter la compaction de l'ADN et arrêter la transcription (J. Y. Wu et al. 2000; Jha, Tripurani, et Johnson 2017).

Une autre structure particulière des spermatozoïdes est le flagelle qui se forme dès le début de la spermiogénèse. Le flagelle est structuré par l'axonème qui permet la mobilité du spermatozoïde. Il se développe à l'un des pôles de la spermatide par la formation d'un réseau de microtubules à partir des centrioles (Lehti et Sironen 2017).

Enfin, la spermiation permet la maturation ultime du spermatozoïde avant la fécondation et le relargage du spermatozoïde dans la lumière des tubes séminifères (O'Donnell et al. 2011).

Figure 2.12 : Généralité sur la spermatogénèse



Issu de (Hogarth et Griswold 2013)

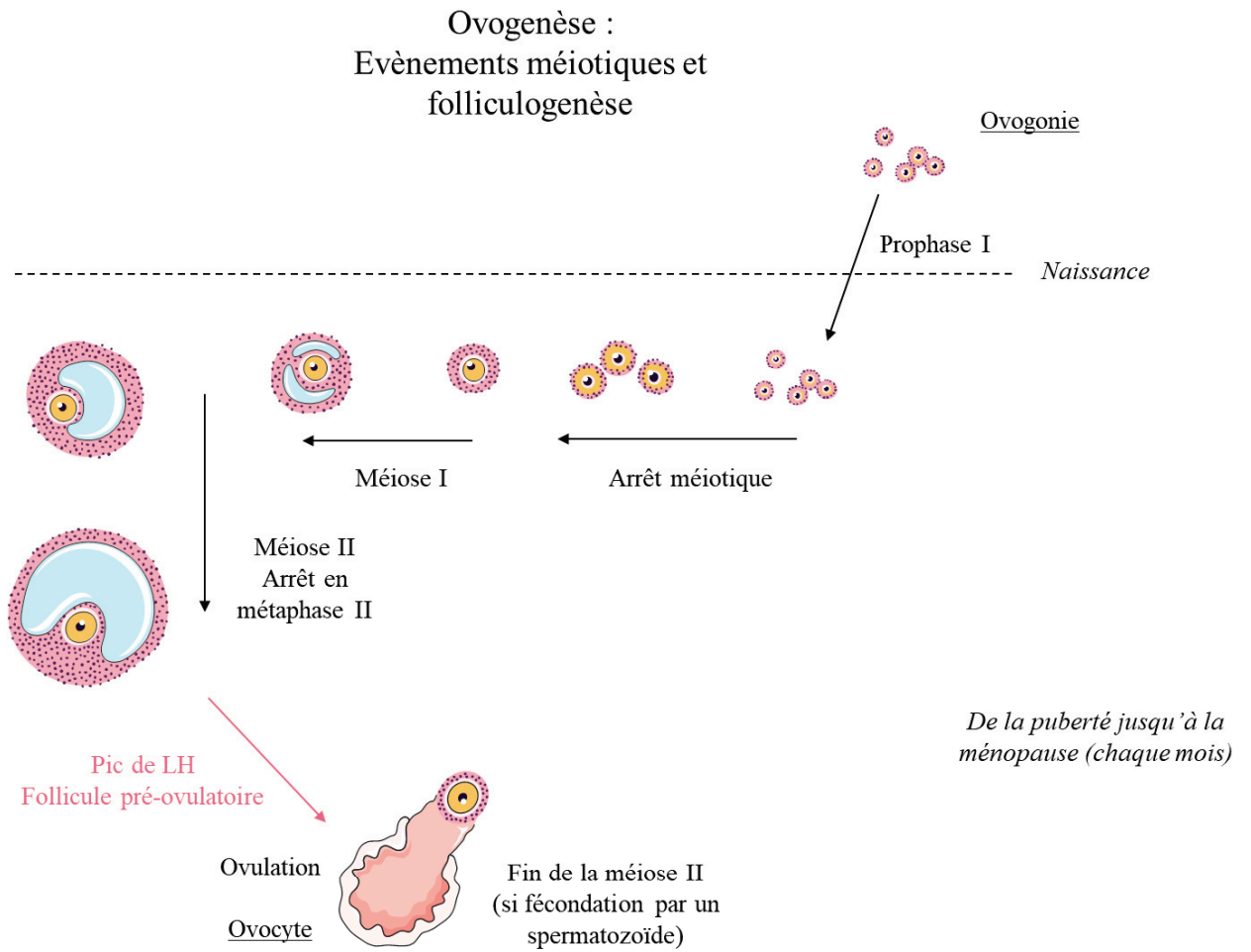
L'ovogenèse, généralités

Chez la souris XX, l'entrée en méiose des gonocytes a lieu à 13.5 *jpc*. La méiose est réalisée jusqu'au stade diplotène de la première division. Il est possible par coloration histologique de différencier les stades leptotène, zygotène, pachytène et diplotène de prophase I. Aux alentours de la naissance, les ovogonies s'arrêtent au stade diplotène de prophase I, qu'elles compléteront à la puberté (Trautmann et al. 2008). A 13.5 *jpc*, l'entrée en méiose est marquée par la perte du marqueur de pluripotence *Pou5f1* et par l'expression du gène *Stra8* (Speed 1982).

La méiose commence par un stade prophase, une phase complexe qui se subdivise en cinq stades: leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diakinésie. Par la suite, les ovocytes passent au stade diplotène où ils entrent dans une phase de repos prolongée appelée dictyat (pour revue voir (Hunt et Hassold 2008)). Tout au long de la folliculogenèse, les ovocytes restent au stade dictyat de la méiose I (voir Chapitre 1 : Formation de la gonade et détermination du sexe chez la souris). Le premier pic de l'Hormone Lutéinisante (LH) va être l'initiateur de la reprise de la méiose et de la maturation finale des ovocytes (chez la plupart des mammifères) (Sánchez et Smitz 2012). La maturation des ovocytes est divisée en deux étapes majeures. Dans un premier temps, les ovogonies vont reprendre les divisions de méiose afin de la compléter. Ce processus se déroule au cours de la folliculogenèse basale (Szybek 1972). L'ovocyte progresse jusqu'au stade métaphase II de la méiose et s'arrête à nouveau. Dans un deuxième temps, le cytoplasme de l'ovocyte va se développer juste avant la fécondation. La maturation cytoplasmique est nécessaire à l'accumulation d'ARN maternels qui seront nécessaires et suffisants pour permettre le développement de l'embryon précoce après la fécondation (Sánchez et Smitz 2012).

Enfin, le follicule pré-ovulatoire contenant l'ovocyte mature est prêt à réaliser l'ovulation, induite par la sécrétion de gonadotrophines pré-ovulatoires. La reprise de la méiose n'a lieu que quelques heures avant l'ovulation suite au pic de LH. L'ovulation est caractérisée par la rupture de la paroi du follicule et la libération du complexe cumulus-ovocyte. La dernière étape de méiose s'achèvera au moment de la fécondation par un spermatozoïde.

Figure 2.13 : Généralité sur l'ovogenèse



Chapitre 3 – La voie de signalisation WNT/ β -catenin

La voie de signalisation WNT/ β -catenin appartient aux grandes voies de signalisation du développement embryonnaire comme les voies Hedgehog, Notch, TGF β et BMP. Elle est impliquée dans divers comportements cellulaires tels que les décisions de destin cellulaire, la prolifération et la migration. On la retrouve également impliquée dans de nombreux événements embryologiques importants, notamment la spécification des axes de polarité embryonnaires, la gastrulation et le développement des membres, du cœur ou des neurones (liste non exhaustive pour plus de détails se référer à : <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>.)

Les WNTs sont des morphogènes induisant de multiples mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation (Goldstein et al. 2006; Niehrs et Acebron 2012; Kitajima et al. 2013; Loh, van Amerongen, et Nusse 2016). Les WNTs peuvent se lier à des récepteurs de différentes classes (Amerongen, Mikels, et Nusse 2008). Ainsi les nombreux acteurs de cette voie, que ce soit les ligands, les récepteurs, les composants cytoplasmiques et nucléaires, en font une voie de signalisation très complexe et multigénique, avec un large spectre d'interactions possibles. De plus, en réponse au signal de cette voie, il existe différentes réponses intracellulaires, classées en deux catégories : Canonique, Non Canonique. Toute dérégulation de cette voie a des conséquences importantes pour l'organisme, souvent à l'origine de pathologies dont des cancers.

Les composants moléculaires et les mécanismes de la transduction du signal de la voie WNT/ β -catenin ont commencé à être élucidés par des expériences de génétique et de biochimie dans divers organismes modèles et cellulaires depuis plus de 37 ans.

Quels sont les acteurs de la voie WNT/ β -catenin ?

A la fin des années 1970, les premiers membres de la famille des gènes codant pour les WNTs ont été identifiés de manière indépendante chez la drosophile et la souris. Chez la drosophile, le premier gène *wingless* a été identifié comme un gène impliqué dans la polarité des embryons (Sharma et Chopra 1976). Chez la souris, le gène *int-1* (*integration 1*) a été cloné comme un proto-oncogène*, responsable des tumeurs mammaires (van Ooyen et Nusse 1984). Il s'est avéré que ces deux gènes chez la drosophile et la souris, codaient pour des protéines homologues et la combinaison des deux noms « wingless » et « int-1 » a donné naissance au nom « Wnt ».

Au cours de ce chapitre, je vais détailler dans un premier temps les différents acteurs de la voie WNT/ β -catenin afin par la suite de les replacer dans les deux différentes voies de signalisation de WNT/ β -catenin.

Les ligands WNT de la voie de signalisation WNT/ β -catenin

Les gènes *Wnt* appartiennent à une grande famille de glycoprotéines contenant des homologies de séquences. Tous les membres de la famille ont une taille similaire de 350-400 acides aminés, contenant un motif hautement conservé riche en cystéines et un signal peptide de sécrétion en N-terminal (van Ooyen et Nusse 1984). Dans les différents organismes modèles, on retrouve plus de 100 gènes différents organisés en 13 sous-familles : *Wnt-1* à *Wnt-11*, *Wnt-16* et *Wnt-A*. Des études phylogénétiques rapportent que les gènes *Wnt* sont conservés chez tous les métazoaires et également chez les cnidaires (Kusserow et al. 2005) où toutes les sous familles ne sont pas représentées (telle que la sous-famille *Wnt-9*) (Croce et McClay 2008).

La famille *Wnt* appartient également à la catégorie des morphogènes. Les molécules morphogènes (protéines ou lipides) sont impliquées au cours de l'embryogenèse afin de spécifier différents types cellulaires ou différentes régions d'un organisme selon leur concentration. Ce sont des protéines sécrétées qui diffusent en gradient de concentration pour activer les voies moléculaires ciblées à longue distance.

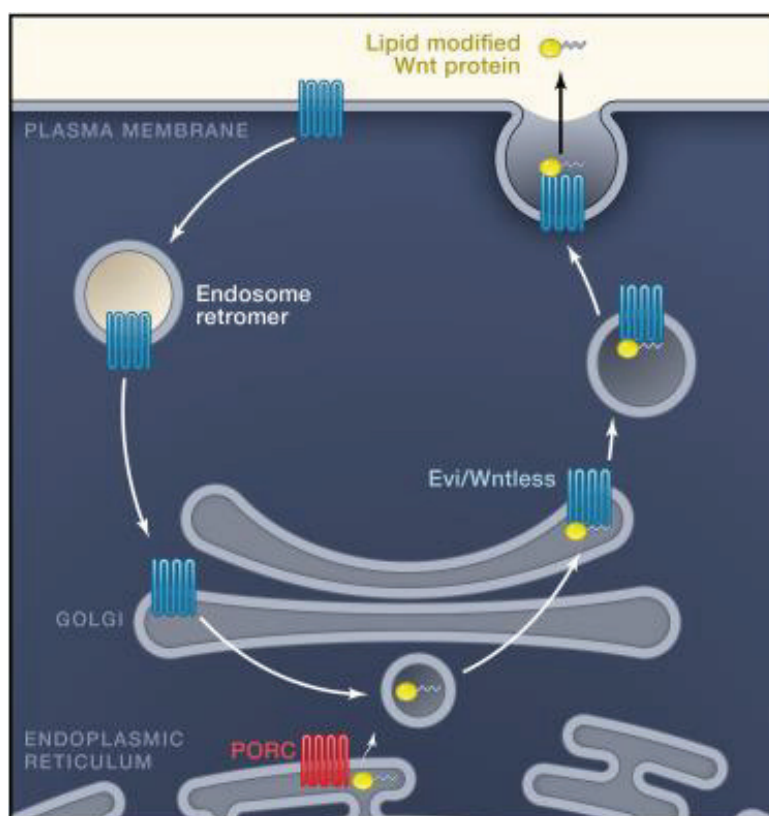
Pour assurer leur sécrétion et leur la diffusion, les protéines WNT subissent des modifications post-traductionnelles comme la palmylation* et la glycosylation* (Willert et al. 2003; MacDonald, Tamai, et He 2009). Ces modifications post-traductionnelles améliorent la liposolubilité de ces protéines, leur permettant d'être sécrétées et de faciliter la signalisation

WNT à longue distance. Les modifications post-traductionnelles sont amenées lors de la biogenèse des protéines WNT dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Les études menées *in vitro* sur des cellules de drosophile et *in vivo* sur les nématodes ont permis d'identifier la protéine Porcupine (PORC) localisée dans le réticulum endoplasmique. PORC via son domaine O-acyl transférase va permettre l'ajout de groupe acétyle nécessaire à la palmitoylation des WNTs en N-terminal (Hausmann, Bänziger, et Basler 2007; Rios-Esteves et Resh 2013).

La protéine Wntless (WLS : protéine multipass*) intervenant dans le trafic de protéines membranaires a été identifiée comme étant nécessaire à la sécrétion des WNTs. A la suite des modifications lipidiques, WLS prend le relais et escorte dans le Golgi les WNTs jusqu'à la membrane plasmique pour la sécrétion (Hausmann, Bänziger, et Basler 2007). WLS est ensuite recyclé par endocytose et renvoyé au Golgi par un complexe protéique appelé Rétromère. La perte de fonction du Rétromère entraîne une réduction de la sécrétion des WNTs due à la dégradation de WLS par le lysosome (Belenkaya et al. 2008).

Figure 3.1 : Modification post-traductionnelle et sécrétion des WNTs



Issu de (Clevers et Nusse 2012).

La façon dont les WNTs extracellulaires sont diffusés/transférés aux cellules cibles reste mystérieuse, mais des études suggèrent que les protéines ne sont pas présentes sous une forme libre. Plus probablement, les protéines WNTs sont incorporées dans des vésicules

de sécrétion ou des exosomes (Gross et al. 2012; Korkut et al. 2009; Saha et al. 2016). Ces vésicules contiennent WLS lié aux WNTs matures (Korkut et al. 2009) sous une forme telle que la protéine WNT soit présente à l'extérieur de la vésicule, disponible pour se lier aux récepteurs. Enfin, différentes études ont mis en évidence l'implication des protéines HSPG (Heparan sulfate proteoglycans). Ces protéines transmembranaires sont nécessaires pour le transport, la stabilisation et la présentation des WNTs aux cellules (Hacker, Lin, et Perrimon 1997; Lin 2004; Goto et al. 2001).

Les WNTs vont diffuser pour ensuite se lier à leurs récepteurs et activer des voies de signalisation spécifiques.

Il est important de souligner qu'actuellement, le fait que les WNTs sont des morphogènes est de plus en plus remis en question. En effet, chez la drosophile, dans les autres organes que les ailes, les WNTs agissent rarement comme un signal à longue portée (Alexandre, Baena-Lopez, et Vincent 2014). Majoritairement, la voie WNT dépendrait d'un système paracrine dépendant du contact cellule/cellule. Dans l'embryon de drosophile, les WNTs interagiraient avec les cellules exprimant *Engrailed* (facteur de transcription nécessaire à la polarisation de l'embryon) adjacentes aux cellules sécrétant WNTs (van den Heuvel et al. 1989). On retrouve ce mode de diffusion chez les mammifères, où la signalisation WNT semble se produire principalement entre des cellules proches les unes des autres, par exemple dans des niches de cellules souches adultes de l'intestin (T. Sato et al. 2011). Ainsi les WNTs ne sont pas des morphogènes classiques, mais des signaux médiateurs de la signalisation à courte portée.

Les récepteurs de la voie WNT/ β -catenin

Dans les années 1990, deux grandes familles de récepteurs ont été décrites comme acteurs de la voie de signalisation WNT/ β -catenin. La famille des Frizzled (FZ) comporte des protéines à sept domaines transmembranaires avec une longue extension N-terminale riche en cystéines (CRD). Les protéines WNTs se lient directement au domaine CRD des FZ. Cette famille est décrite pour la première fois chez la drosophile (Bhanot et al. 1996). Chez les mammifères, la famille des FZ est représentée par 10 gènes qui présentent une activité fonctionnelle redondante (Binnerts et al. 2007).

La famille des LRP ou ARROW chez la drosophile est la deuxième famille de récepteurs de la voie WNT/ β -catenin (Wehrli et al. 2000). Les LRPs (LDL receptor-related proteins 5 and 6, LRP5/6) sont des protéines transmembranaires à un seul passage dans la bicouche phospholipidique (Pinson et al. 2000; Tamai et al. 2000). Il semble qu'entre les deux LRPs, LRP6

joue un rôle plus dominant et il est essentiellement exprimé au cours de l'embryogenèse, alors que LRP5 est essentiellement retrouvé exprimé chez l'adulte et essentiel dans l'homéostasie osseuse. Néanmoins, LRP5 et LRP6 sont partiellement redondants car leurs fonctions sont nécessaires à la gastrulation de l'embryon de souris (X. He et al. 2004).

Il est décrit qu'une protéine WNT peut se lier à plusieurs protéines FZ et inversement. De plus, bien que cela n'ait pas été formellement démontré *in vivo*, en se liant à WNT, les FZ coopèrent avec les LRP pour initier le signal WNT (Tamai et al. 2000; Cong, Schweizer, et Varmus 2004).

Enfin, des données récentes montrent que *Derailed*, un autre récepteur WNT, est entièrement distinct des Frizzled. Le récepteur DERAILED appartient à la famille des récepteurs tyrosine kinase transmembranaires appartenant à la sous-famille RYK (ROR2) (Ho et al. 2012). Chez la drosophile, la voie WNT/ β -catenin associée au récepteur DERAILED est impliquée dans le contrôle des axones et leur guidage pendant la croissance (Yoshikawa et al. 2003). Chez les mammifères, deux WNTs (WNT4 et WNT5a) sont impliquées dans le guidage des axones. Il semble que WNT4 signale par un récepteur FZ mais le récepteur de WNT5a n'est pas identifié. Il serait intéressant de déterminer si les récepteurs FZ/LRP et RYK fonctionnent dans les mêmes tissus et régulent les mêmes processus cellulaires et, le cas échéant, si les WNTs entrent simultanément en contact avec les FZ/LRP et les kinases de type RYK ou stimulent les récepteurs RYK et FZ/LRP dans des voies parallèles (Lyuksytova 2003).

La multitude de combinaisons possibles entre les différents récepteurs et les ligands accentue la complexité de l'étude de la voie de signalisation WNT/ β -catenin.

Pour résumer: un WNT particulier peut activer la voie WNT/ β -catenin canonique et/ou non canonique en fonction du récepteur auquel il se lie (Amerongen, Mikels, et Nusse 2008). Généralement, les récepteurs FZ sont impliqués dans les voies impliquant β -catenin et les voies non canoniques. Il est précisé qu'une paire WNT-FZ est capable de recruter LRP5/6 pour activer la voie canonique (X. He et al. 2004). Cependant, certaines observations suggèrent que LRP6 peut être un antagoniste de la signalisation WNT/ β -catenin non canonique *in vivo*, via une compétition pour les ligands WNTs (Bryja et al. 2009). Les autres récepteurs de WNTs, tels que RYK et ROR2, ne sont pas décrits pour la signalisation canonique de WNT/ β -catenin mais peuvent dans certains cas en être antagonistes (Amerongen, Mikels, et Nusse 2008).

Antagonistes et agonistes de la voie de signalisation WNT/ β -catenin

Les antagonistes sécrétés de la voie WNT/ β -catenin

Les antagonistes extracellulaires de la voie WNT/ β -catenin sont divisés en deux classes suivant le mécanisme d'action exécuté pour éviter la liaison du ligand à son récepteur (Figure 3.2).

Les sFRP (protéines apparentées à Frizzled sécrétées) et WIF-1 (Wnt Inhibitory Factor 1) composent la première classe d'antagonistes. Ces deux molécules ont la capacité de se lier aux WNTs afin d'en inhiber la liaison à leurs récepteurs. Les protéines sFRP ont également la possibilité de fixer aux FZs pour bloquer les sites de liaison des WNTs. L'interaction de sFRP ou WIF-1 aux WNTs permet l'inhibition de la signalisation de WNT autant canonique que non canonique (Bovolenta et al. 2008). sFRP et WIF-1 sont des protéines sécrétées qui se lient aux WNTs dans le domaine extracellulaire. La famille des sFRP est composée de 8 membres (sFRP1 à sFRP5 pour les mammifères et Sizzled, Sizzled2 et Crescent qui n'ont pas d'homologue connu pour les mammifères). Sizzled, Sizzled2 contiennent un domaine riche en cystéine (CRD) caractéristique qui partage une homologie avec le CRD des FZs (Jones et Jomary 2002).

Des études de perte de fonction chez la souris ont révélé une redondance significative des gènes de sFRP (Sato et al. 2008).

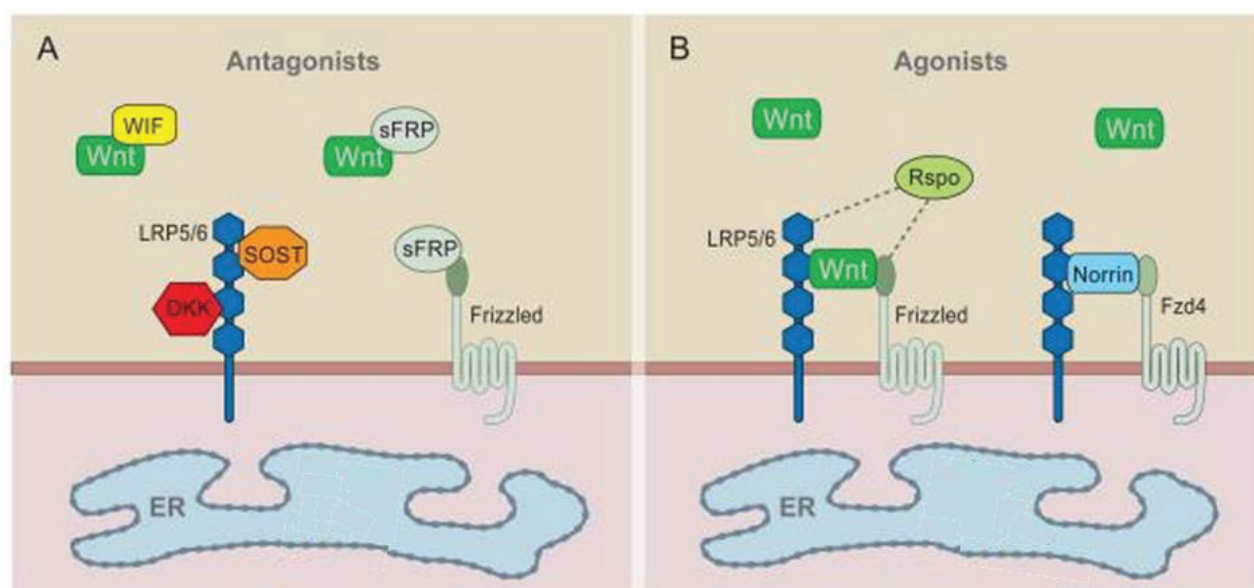
La protéine WIF-1 a été identifiée pour la première fois par des orthologues hautement conservés chez le xénope et le poisson zèbre. WIF-1 ne partage aucune similarité de séquence avec le domaine CRD de FZ ou de sFRP. Il est décrit chez la drosophile comme pouvant se lier à WNT8 dans l'espace extracellulaire et ainsi inhiber les interactions WNT8 – FZ2 (Hsieh et al. 1999).

De plus, des études *in vitro* suggèrent que les sFRP et WIF-1 peuvent également réguler la stabilité et le transport extracellulaire des WNTs. Ce potentiel, en dehors du rôle d'inhibition de la voie *Wnt*, aurait une relation avec la concentration extracellulaire des acteurs (Üren et al. 2000).

La deuxième classe d'antagonistes est composée de la famille des Dickkopf (DKK) et la famille WISE/SOST. Ces deux familles d'antagonistes inhibent spécifiquement les LRP5 et 6 et ainsi la voie WNT/ β -catenin canonique (M. Semënov, Tamai, et He 2005; Itasaki et al. 2003; Mao et al. 2002).

La famille DKK comprend quatre membres (DKK-1 à DKK-4) et une protéine unique apparentée à DKK-3 appelée Soggy (SGY). Les DKKs contiennent deux domaines caractéristiques riches en cystéines (CYS-1 et CYS-2) séparés par une région de liaison de longueur variable (Krupnik et al. 1999). Des premières études ont montré que les DKKs induiraient l'endocytose des récepteurs LRPs, empêchant ainsi la liaison des ligands WNTs (Mao et al. 2002; M. V. Seménov et al. 2001). Mais récemment, cette hypothèse a été contredite et à l'heure actuelle le mécanisme d'action des DKKs reste obscur (M. V. Seménov, Zhang, et He 2008; K. Wang et al. 2008).

Figure 3.2 : Antagonistes et Agonistes sécrétés de la voie WNT/ β -catenin



A. Antagonistes des WNTs . WIF et sFRP se lient directement aux WNTs sécrétés dans le milieu extracellulaire. sFRP peut également se lier aux récepteurs FZs. Ils sont considérés comme des inhibiteurs généraux de la voie WNT/ β -catenin. DKK et SOST/WISE se lient spécifiquement aux LRPs pour éviter l'interaction entre FZ-LRPs. Ils sont considérés comme des inhibiteurs spécifiques de la voie WNT/ β -catenin canonique.

B. WNT agonistes. Norrin agit comme les ligands WNTs. Il se lie aux récepteurs et forme un complexe Norrin-FZ-LRPs. Actuellement, on ne lui connaît que des affinités pour le FZ4. Les protéines RSPONDINS peuvent se lier aux récepteurs de type LRPs et FZ. Issu de (MacDonald, Tamai, et He 2009).

Les agonistes sécrétés de la voie WNT/ β -catenin

Les protéines NORRIN et R-SPONDINS (RSPOs) sont deux familles d'agonistes qui activent la voie de signalisation WNT/ β -catenin (Figure 3.2).

Norrin, une protéine avec un domaine « nœud cystéine », est un ligand spécifique de FZ4 et agit par l'intermédiaire de FZ4 et de LRP5/6 au cours de la vascularisation de la rétine (Xu et al. 2004). La fonction de NORRIN a été décrite pour la première fois dans un modèle murin

perte de fonction, où l'absence de NORRIN induit un défaut de vascularisation de la rétine (Richter et al. 1998). NORRIN est capable d'activer la voie WNT/ β -catenin en se liant au récepteur FZ4 et LRP5/6 afin d'activer des voies de l'angiogenèse. Il active spécifiquement la voie WNT/ β -catenin canonique.

Les quatre protéines RSPOs sécrétées sont des agonistes uniques de la signalisation initiée par WNTs. Les premières preuves expérimentales du rôle des RSPOs dans l'activation de la voie WNT/ β -catenin proviennent d'un criblage d'expression effectué chez des embryons de xénope en 2004 (Kazanskaya, Glinka, del Barco Barrantes, et al. 2004). La famille des RSPOs est caractérisée par la présence d'un peptide signal en N-terminal, suivi de deux répétitions furines riches en cystéine et de répétitions de domaines thrombospondine (TSR) (W. B. de Lau, Snel, et Clevers 2012). Les deux répétitions furine près de l'extrémité N-terminale de la protéine mature forment le domaine d'action nécessaire et suffisant pour exercer l'activité d'agoniste de la voie WNT/ β -catenin (Kazanskaya, Glinka, del Barco Barrantes, et al. 2004). Le domaine TSR peut servir à la liaison glycosaminoglycane/protéoglycane, comme on le voit pour d'autres protéines. Récemment, le protéoglycane transmembranaire syndécane-4 (protéines HSPG) a été identifié comme étant un récepteur de RSPO3 (Ohkawara, Glinka, et Niehrs 2011).

Les homologues de RSPOs, définis comme des protéines hébergeant deux domaines de furine combinés à un domaine de TSR-1, sont présents chez tous les vertébrés et certains chordés primitifs. Aucun homologue n'a été trouvé dans les organismes modèles d'invertébrés tels que *Drosophila* et *Caenorhabditis* (W. B. de Lau, Snel, et Clevers 2012).

Les protéines RSPOs peuvent interagir physiquement spécifiquement avec les récepteurs FZs et LRPs (Nam et al. 2006) afin d'activer la voie WNT/ β -catenin. De récentes études ont pu décortiquer les mécanismes d'action des RSPOs sur la voie WNT/ β -catenin, que je vais détailler dans la sous partie du Chapitre 3 « Le module Lgr5/Rnf43/R-Spondin d'amplification du signal WNT/ β -catenin. »

Znrf3 et Rnf43 des antagonistes non sécrétés de la voie de signalisation WNT/ β -catenin

La régulation de la force du signal WNT/ β -catenin au niveau du récepteur est devenue encore plus complexe avec l'identification de deux gènes cibles homologues : *Rnf43* et *Znrf3*. En effet la voie de signalisation WNT/ β -catenin n'est pas seulement régulée par des anta/agonistes extracellulaires. Des études ont montré que des protéines étaient capable d'initier l'internalisation/dégradation (KREMEN (Mao et al. 2002)) des récepteurs ou de les piéger dans le réticulum endoplasmique, empêchant FZ d'atteindre la surface cellulaire (SHISA

(Yamamoto et al. 2005). Parmi ces antagonistes non sécrétés, on trouve ZNRF3 et RNF43 (Peng et al. 2013).

L'expression spécifique de *Rnf43* a déjà été détectée dans les cancers du côlon humain (Ivanov et al. 2007) sans preuve de son rôle dans l'inhibition de la voie WNT/ β -catenin.

Zinc RING finger 3 (ZNRF3) et son homologue RING finger 43 (RNF43) sont des ubiquitine ligases E3 trans-membranaires. Elles contiennent un domaine extracellulaire associé à une protéase N-terminale (PA), une hélice transmembranaire à un seul passage et un domaine RING C-terminal intracellulaire avec une activité E3 ligase (Hao et al. 2012).

Des mutations de ZNRF3 ou de RNF43 ont été associées à des adénocarcinomes gastriques* (Zhou et al. 2013), à des adénocarcinomes canaux pancréatiques* (Jiang et al. 2013), à des cholangiocarcinomes* (Ong et al. 2012) et à des tumeurs ovariennes mucineuses* (Ryland et al. 2013).

La protéine GRAIL appartient à la famille Goliath chez le nématode et possède une activité ubiquitine ligase E3 au niveau du domaine RING. L'étude de cette protéine a permis de déterminer le rôle de la ligase E3 transmembranaire et du domaine PA qui régule l'expression à la surface cellulaire de récepteurs membranaires spécifiques sur les lymphocytes T (Vilella et al. 2009). Cette découverte et l'étude phylogénétique des protéines RING ont permis de faire le lien avec la voie WNT/ β -catenin.

RNF43 et ZNRF3 interviennent spécifiquement dans la multi-ubiquitination de lysines dans les boucles cytoplasmiques du domaine 7 trans-membranaire des FRIZZLEDS (Hao et al. 2012; Koo et al. 2012). Il en résulte une endocytose rapide des récepteurs FZs de la voie *Wnt* et leur destruction dans les lysosomes. La base structurelle de la manière dont RNF43 et ZNRF3 identifient les Frizzled en tant que substrats spécifiques n'est actuellement pas connue.

De plus, le modèle murin perte de fonction de *Rnf43* a permis d'identifier qu'il est une cible de la voie WNT/ β -catenin, suggérant un fonctionnement de cet antagoniste comme un régulateur de rétroaction négatif de l'expression du récepteur des WNTs. La perte d'expression de ces deux ligases E3 entraîne une hyperréactivité aux signaux WNT endogènes (Hao et al. 2012; Koo et al. 2012).

Le module Lgr5/Rnf43/R-Spondin d'amplification du signal WNT/ β -catenin

Au cours des dernières années, la compréhension des mécanismes de régulation de la voie WNT/ β -catenin et des rôles fonctionnels des RSPOs dans de nombreux contextes biologiques s'est améliorée, en particulier parce que le gène *Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5* (*Lgr5*) a été identifié ainsi que deux protéines étroitement apparentées, LGR4 et LGR6, comme récepteurs des RSPOs. De plus, l'interaction des RSPOs et des LGRs a été décrite comme activant la voie de signalisation WNT/ β -catenin canonique et non canonique (Carmon et al. 2011; Glinka et al. 2011).

LGR4 et LGR5 ont été identifiés en 1998 chez le nématode et chez la drosophile (McDonald et al. 1998). Ces récepteurs appartiennent à la grande famille des protéines à 7 domaines transmembranaires couplées aux protéines G. Ils sont uniques car ils ont un grand domaine extracellulaire N-terminal qui contient une série de répétitions riches en leucines. La famille est composée de deux membres principaux, LGR4 et LGR5, et depuis les années 2000, un troisième membre de la sous famille s'est rajouté, LGR6 (Barker et Clevers 2010). LGR4 et LGR5 ont longtemps été considérés comme des récepteurs orphelins dont on ne connaissait pas les ligands mais qu'on savait être impliqués dans la biologie des cellules souches (Mustata et al. 2011).

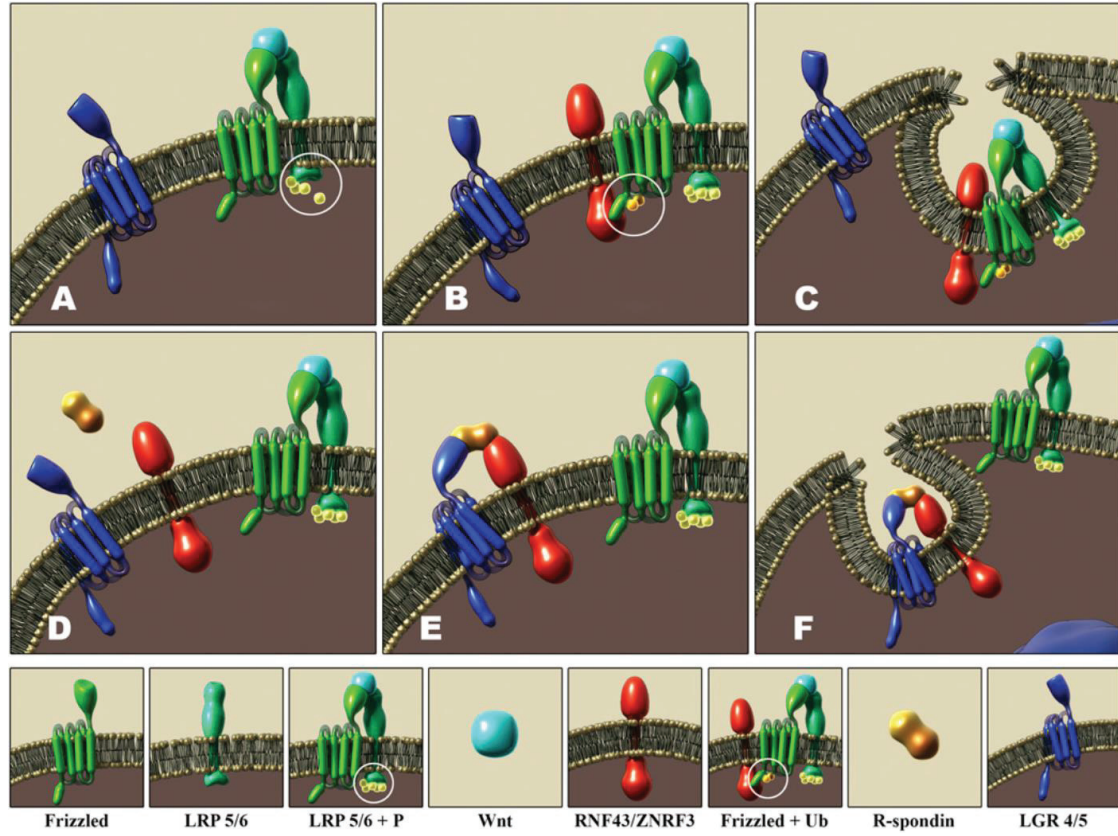
On sait maintenant que les domaines furine des RSPOs interagissent directement avec les LGRs, ce qui fait depuis peu des RSPOs des ligands connus de ces récepteurs (Carmon et al. 2011; Glinka et al. 2011).

Des études biochimiques *in vitro* ont rapporté que LGR5 – RSPO1 formaient un complexe ternaire avec les ubiquitines ligases ZNRF3 ou RNF43 (Hao et al. 2012). Le domaine furine des RSPOs est reconnu par les récepteurs ZNRF3 ou RNF43, créant une interaction forte entre ces protéines (Peng et al. 2013).

Cette découverte suggère un mécanisme par lequel RSPO1 potentialise la signalisation WNT/ β -catenin. En tant que gène cible de la voie WNT/ β -catenin, ZNRF3/RNF43 équilibre la signalisation WNT/ β -catenin en fournissant une clairance membranaire à l'état d'équilibre du complexe Fz – LRP (Figure 3.3) (Hao et al. 2012; Koo et al. 2012; Peng et al. 2013). En interagissant avec ZNRF3/RNF43 et en induisant leur endocytose, RSPO1 inhibe les activités de ZNRF3/RNF43 et stabilise le niveau d'expression des récepteurs des WNTs, Fz – LRP, à la membrane cellulaire, pour maintenir l'activité de la signalisation Wnt canonique et non canonique. Il est important de noter que la clairance membranaire de ZNRF3 médiée par

RSPO1 dépend de LGR, ce qui est corroboré par les données biochimiques selon lesquelles les trois protéines pourraient former un complexe physique (Hao et al. 2012; W. de Lau et al. 2014).

Figure 3.3 : Le module Lgr5/Rnf43/R-Spondin d'amplification du signal WNT/ β -catenin



Issu de (W. de Lau et al. 2014).

En résumé, en absence des RSPOs, le ligand WNT va activer la voie WNT/ β -catenin via le complexe récepteur FZ-LRPs. En réponse au signal, les récepteurs ZNRF3/RNF43 sont recrutés à la membrane pour éteindre la voie WNT/ β -catenin en induisant l'endocytose et la dégradation du complexe WNT-FZ-LRPs par le lysosome. En présence des ligands RSPOs, lorsque la voie WNT/ β -catenin est activée, la liaison des ligands RSPOs aux LGRs va former un complexe RSPO-LGR-ZNRF3/RNF43. Ce complexe va être endocytosé puis dégradé par le lysosome, empêchant ainsi l'inhibition du signal WNT/ β -catenin.

La voie WNT/ β -catenin canonique

L'acteur principal de la voie WNT/ β -catenin canonique est la protéine β -catenin (CTNNB1) codé par le gène *Ctnnb1*. La protéine β -catenin a été découverte en 1990 sous le nom d'Armado chez la drosophile (Riggelman, Schedl, et Wieschaus 1990). Elle a été identifiée à l'origine dans des jonctions adhérentes de cellules où elle fonctionne pour relier le domaine cytoplasmique des cadhérines à l' α -catenin et au cytosquelette d'actine (McCrea, Turck, et Gumbiner 1991). La β -catenin est une protéine multifonctionnelle de 90 kD qui contribue à de nombreux processus cellulaires dans des conditions physiologiques. Dans les cellules on distingue 2 sources distinctes de β -caténine :

- 1) une source de β -catenin – E-cadhérine associée à la membrane plasmique ;
- 2) une source de β -catenin associée au cytoplasme/noyau dans la signalisation WNT/ β -catenin (Peifer et al. 1992).

La protéine est composée de 781 acides aminés formant un noyau structurel central de 12 répétitions de Armadillo (Huber, Nelson, et Weis 1997). La région Armadillo est un sillon chargé positivement qui constitue la surface de liaison pour la majorité des partenaires de β -catenin, dont beaucoup sont critiques pour l'adhésion cellulaire et la signalisation WNT/ β -catenin (Huber, Nelson, et Weis 1997; Spink, Fridman, et Weis 2001; Huber et Weis 2001; Graham et al. 2002; Daniels et Weis 2002). Les séquences des domaines terminaux de β -catenin sont moins conservées que le domaine répété d'Armadillo. Les domaines N et C-terminaux interviennent dans un ensemble d'interactions protéine-protéine qui permettent à la protéine de fonctionner comme un échafaudage pour les assemblages multi-protéiques (Xing et al. 2008). Par exemple, le domaine N-terminal de la β -catenin relie le complexe β -catenin/E-cadhérine à l' α -catenin, qui est un régulateur clé du cytosquelette d'actine (Drees et al. 2005). De plus, lors de la dégradation de la β -catenin cytosolique, la β -catenin est ubiquitinée lorsque son extrémité N-terminale phosphorylée est reconnue par l'ubiquitine ligase β -TrCP (G. Wu et al. 2003).

Activation de la voie de signalisation WNT/ β -catenin

En 1995, les résultats combinés d'expériences de génétique chez la mouche, la souris et le xénope, et d'expériences de culture de cellules ont permis de tracer les grandes lignes d'une voie de signalisation WNT/ β -catenin. La voie WNT/ β -catenin est une voie de signalisation inhabituelle par rapport aux autres voies connues en 1995. Les voies « habituelles » consistent principalement en une succession de phosphorylations de protéines, avec des associations de protéines basées sur la reconnaissance de domaines phosphorylés. Dans la signalisation Wnt, le composant connu le plus en amont est une protéine cytoplasmique à fonction biochimique incertaine, Disheveled, qui ensuite inhibe la protéine kinase GSK3 (Peifer et al. 1991; Siegfried, Chou, et Perrimon 1992; Noordermeer et al. 1994).

Depuis, on a pu décortiquer la voie canonique WNT/ β -catenin en combinant les études des différents organismes modèles avec l'étude des pathologies associées à des dérégulations de cette voie.

La liaison d'une protéine WNT mène à la dimérisation des deux récepteurs FZ-LRP (Janda et al. 2017). Ce mécanisme conduirait à un changement de conformation des récepteurs, induisant le signal WNT/ β -catenin.

La queue cytoplasmique des LRPs, après phosphorylation par plusieurs protéines kinases (dont une médiée par GSK3 β), recrute la protéine d'échafaudage Axis Inhibition Protein (AXIN) (Stamos et al. 2014).

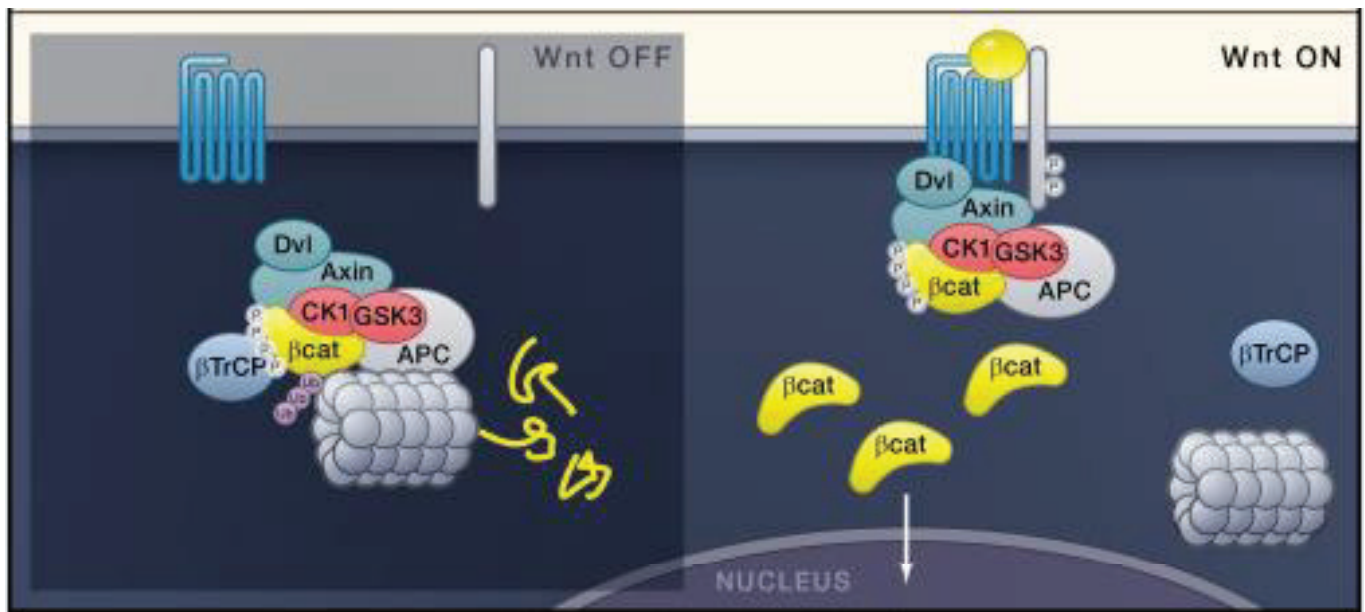
Le rôle du FZ dans la médiation du signal de WNT/ β -catenin est encore peu connu. En présence d'un WNT, la partie cytoplasmique de FZ se lie à la protéine Disheveled (DVL) (W. Chen et al. 2003; Tauriello et al. 2012). L'interaction FZ-DVL fournirait alors une plateforme pour l'interaction entre la queue de LRP et AXIN (Schwarz-Romond et al. 2007).

En conséquence, l'ensemble du complexe de dégradation est recruté à la membrane plasmique (Tamai et al. 2004). Cela permet à la β -catenin non phosphorylée de s'accumuler et initie ainsi l'état ON de la voie de signalisation.

Inhibition de la voie de signalisation WNT/ β -catenin

En l'absence des ligands WNTs, la β -catenin cytoplasmique est recrutée par un complexe de dégradation multi-protéique. Ce complexe est composé par la protéine AXIN qui agit comme un échafaudage, interagissant avec la protéine β -catenin, la protéine Adenomatous Polyposis Coli (APC) et deux protéines sérine-thréonine kinases constitutivement actives (CK1 α/δ et GSK3 α/β) (Behrens et al. 1998; Spink, Fridman, et Weis 2001; E. Lee et al. 2003). Lorsque la β -catenin est associée à ce complexe de dégradation, la CK1 et la GSK3 β phosphorylent séquentiellement β -catenin au niveau d'une série de fragments Ser/Thr N-terminaux régulièrement espacés (Chunming Liu et al. 2002). La protéine β -catenin phosphorylée est ensuite reconnue par la protéine de réplication β -TrCP, composante d'une ubiquitine ligase E3 qui va multi-ubiquitinyler β -catenin. En conséquence, la β -catenin ubiquitinylée est ciblée pour une destruction rapide par le protéasome (Aberle et al. 1997). Enfin, comme la protéine β -catenin est dégradée, elle n'est pas transloquée dans le noyau et ne peut activer ses gènes cibles.

Figure 3.4 : La voie de signalisation WNT/ β -catenin canonique



Issu de (Clevers et Nusse 2012).

La fonction nucléaire de la protéine β -catenin

Lors de l'activation de la voie WNT/ β -catenin, la β -catenin s'accumule dans le cytoplasme et le noyau, où elle engage des facteurs de transcription T-cell factor/lymphoid (TCF/LEF) liés à l'ADN (Behrens et al. 1996). Dans l'état «éteint», les TCFs interagissent avec les protéines Groucho-Related Protein GRG/TLE (ou Groucho chez la drosophile) pour assurer la médiation de la répression transcriptionnelle (Cavallo et al. 1998). Dans l'état « activé », l'engagement de la β -catenin convertit de manière transitoire les TCF en activateurs de la transcription.

Aujourd'hui, grâce aux nouvelles technologies, nous savons que le mécanisme d'action nucléaire de la β -catenin est plus compliqué.

Les protéines GRG/TLE sont des co-répresseurs de transcription généraux et il a été démontré qu'elles interagissaient avec les histones désacétylases, des enzymes qui maintiennent la chromatine dans un état de transcription inactive (Fisher et Caudy 1998; Brantjes et al. 2001; G. Chen et Courey 2000). Le recrutement d'histones désacétylases dans la région du promoteur TCFf/LEF peut neutraliser les effets positifs de CBP/p300 et de Brg-1* (BRG-1 : Transcription Activator aussi connu sous nom de ATP-dependent chromatin remodeler SMARCA4). BRG1 active ou réprime la transcription) et ainsi peut renforcer la répression de la signalisation WNT/ β -catenin.

En l'absence de β -catenin, la protéine GRG/TLE en conformation tétramère fait partie intégrante d'un complexe de transcription à protéines multiples appelé WNT enhanceosome. Il est attaché aux amplificateurs de la transcription *via* son association avec les TCF afin de les réserver pour des réponses WNTs propices (Fiedler et al. 2015; van Tienen et al. 2017). La réactivité de ce complexe est conférée par Pygopus (PYGO) qui se fixe sur son module de base Chip/LDB-SSDP (ChiLS) et capture l'armadillo de la β -catenin *via* l'adaptateur BCL9/Legless (Kramps et al. 2002; Townsley, Cliffe, et Bienz 2004). Chez la drosophile, la fonction de PYGO devient en grande partie indispensable si GRG/TLE est éliminé par mutation (Mieszczanek, de la Roche, et Bienz 2008), suggérant que PYGO permet à β -catenin d'avoir accès au TCF et de surmonter la répression dépendante de Groucho.

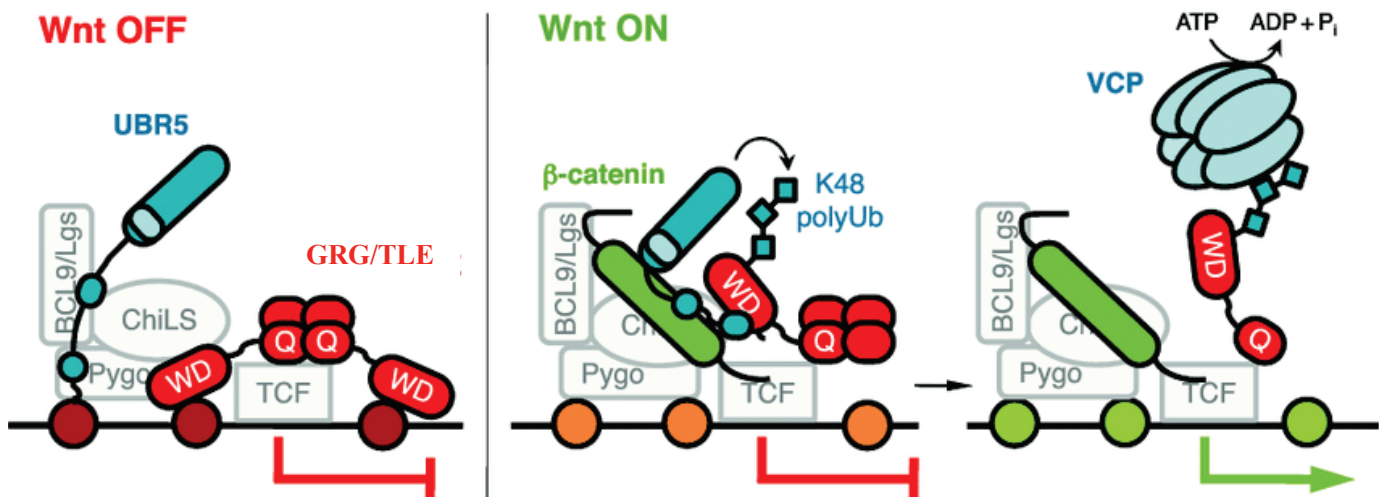
Lorsque la voie WNT/ β -catenin est activée, la protéine β -catenin entre dans le noyau, s'ancre sur le WNT enhanceosome et induit un changement de conformation (van Tienen et al. 2017).

BCL9/L va relier l'extrémité N-terminale de la β -catenin à PYGO, permettant ainsi son intégration dans le complexe WNT enhanceosome (Brack et al. 2009). Une fois ancrée, l'extrémité C-terminale de la β -catenin agit comme un domaine d'activation de la transcription

(van de Wetering et al. 1997). Elle lie des modificateurs d'histones tels que CBP et BRG-1 qui vont alors permettre l'activation de la chromatine (Städeli, Hoffmans, et Basler 2006).

De plus, ces modifications aboutissent au recrutement et à l'apposition de la E3 ubiquitin-protein ligase UBR5 sur GRG/TLE lié au TCF. Cela en fait un substrat pour l'activation et le déploiement dépendant de la valosin-containing protein VCP/p97*. La protéine VCP va déstabiliser le tétramère de GRG/TLE et soulager ainsi la chromatine condensée, permettant l'activation de la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation WNT/ β -catenin (Flack et al. 2017).

Figure 3.5 : La β -catenin permet de lever la répression de GRG pour activer la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation WNT/ β -catenin



Issu de (Flack et al. 2017).

Quelques gènes cibles de la voie WNT/ β -catenin canonique

La voie de signalisation WNT/ β -catenin régule la prolifération, la spécification et la différenciation de différents types cellulaires au cours de nombreux processus de développement et elle contrôle également l'homéostasie des tissus adultes. Ainsi ses gènes cibles sont multiples et divers. En 2008, une étude transcriptomique des gènes cibles met en évidence la complexité de la tâche. L'activation de la voie WNT/ β -catenin conduit à l'induction et à la répression de centaines de gènes. En plus de la régulation par rétroaction de la voie WNT/ β -catenin elle-même, elle présente divers niveaux de régulation temporelle et fonctionnelle. On note cependant que la plupart des gènes cibles des WNTs sont spécifiques à un type de cellule et à un stade de développement donnés (Vlad et al. 2008).

Parmi les gènes cibles, on trouve les gènes *Axin2*, *Dkk1*, *Rspo*, *Tcf/Lef*, *Fz* et *Lrp6* (Logan et Nusse 2004). Ces gènes constituent des boucles de rétroaction négatives/positives qui régulent la signalisation WNT/ β -catenin. La caractéristique rétroaction positive est souvent exploitée au cours de la carcinogenèse du côlon (Arce, Yokoyama, et Waterman 2006; Hoppler et Kavanagh 2007).

En revanche, le gène *Axin2* représente un gène cible « universel » qui par conséquent est souvent utilisé comme indicateur de l'activité canonique de la voie WNT/ β -catenin (Lustig et al. 2002).

Sur le site de la Wnt Home Page, il y a un lien où sont regroupées les études de plusieurs laboratoires qui ont identifié des cibles de la voie Wnt au moyen de profils d'expression génique ou d'autres approches génomiques : https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes_microarray.

De nombreux gènes du cycle cellulaire comme *CyclinD1* ou *c-Myc* sont des cibles directes de la voie WNT/ β -catenin (T. He 1998; Sansom et al. 2005).

Plus particulièrement, les cibles de la voie de signalisation WNT/ β -catenin sont impliquées dans la différenciation ou le maintien de la pluripotence des cellules souches de l'organisme. Ainsi, *Pou5f1* et *Nanog* sont des gènes cibles de la WNT/ β -catenin via la protéine TCF3. En effet, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (Chip-seq) a mis en évidence que TCF3 co-occupe les loci codant pour les facteurs de transcription *Pou5f1* et *Nanog* dans les cellules souches embryonnaires (Cole et al. 2008). Ces résultats indiquent que la voie WNT/ β -catenin régule l'expression de *Pou5f1* et *Nanog* afin de maintenir l'état de pluripotence des cellules souches embryonnaires en culture.

Une étude menée *in vivo* chez le xénope lors du développement neuronal de la rétine montre que le récepteur FZ, Xfz5 est impliqué dans le contrôle de l'expression de *Sox2*, un gène de pluripotence exprimé dans les cellules souches embryonnaires et dans les cellules germinales. Le blocage de la signalisation Xfz5 ou WNT/ β -catenin canonique dans la rétine en développement inhibe l'expression de *Sox2*, et réduit la prolifération cellulaire (Van Raay et al. 2005).

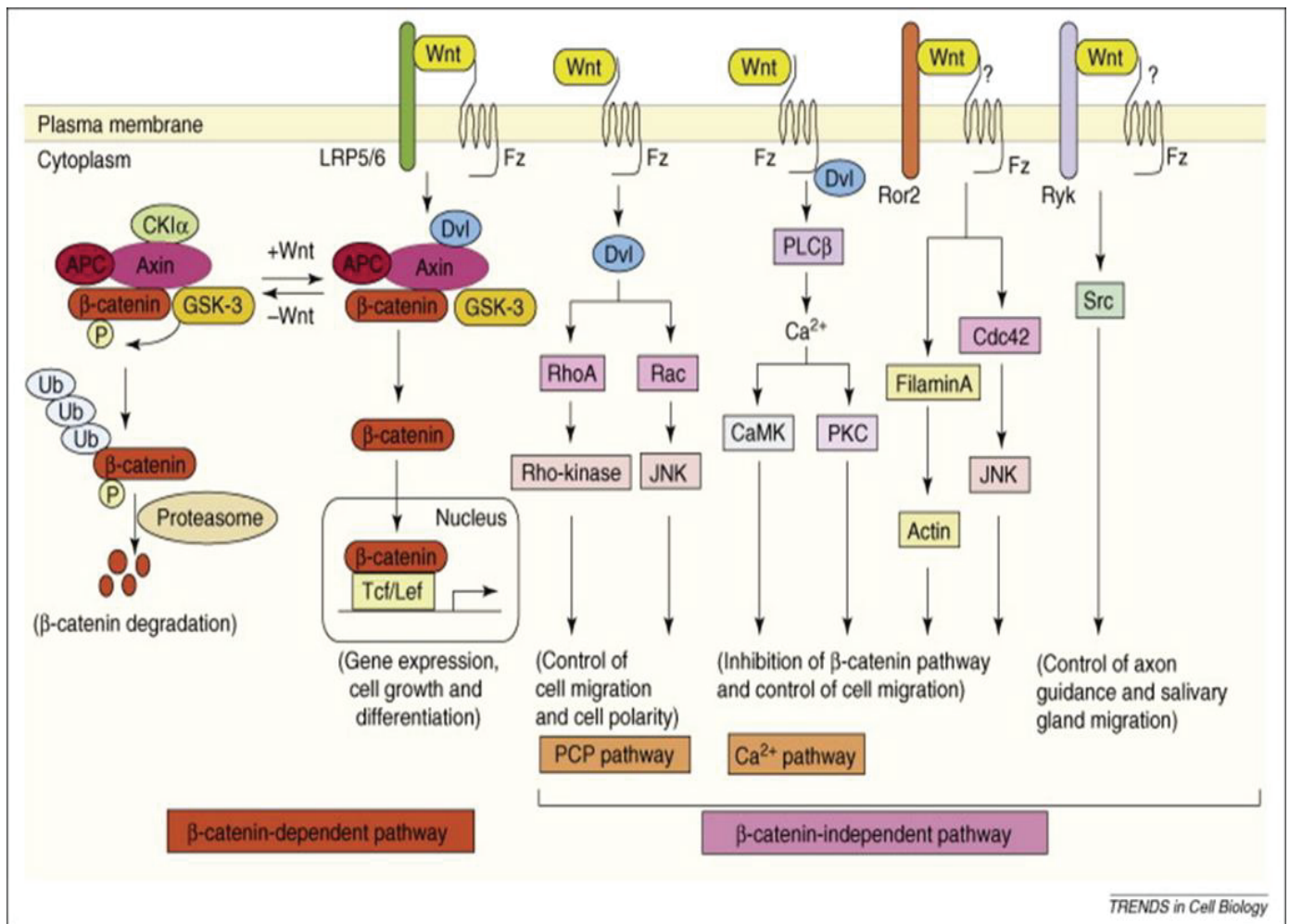
Par ailleurs, *Caudal Type Homeo Box Transcription Factor 1 (Cdx1)* est un gène cible direct de la voie WNT/ β -catenin. *Cdx1* appartient à la famille des *Cdx (Cdx1,2,3 et 4)*. Leur expression est souvent localisée dans l'endoderme en développement et persiste dans l'intestin adulte au niveau des cryptes. La région promotrice du gène *Cdx1* contient plusieurs motifs de liaison au TCF, qui se lient aux complexes TCF/LEF1/ β -catenin et assurent la médiation de la transactivation dépendante de la β -catenine. Lors de la stimulation par un WNT, l'expression de *Cdx1* peut être induite dans les cellules souches embryonnaires de souris. Les embryons de souris déficients en *Tcf4* présentent une perte de l'expression de la protéine CDX1 dans l'épithélium de l'intestin grêle (Lickert et al. 2000; Pilon et al. 2007).

Ainsi la voie de signalisation WNT/ β -catenin possède de nombreux gènes cibles impliqués dans différents mécanismes cellulaires et en particulier dans la prolifération, le maintien de l'état souche et la différenciation au cours du développement et de l'homéostasie des organes adultes.

La voie WNT/ β -catenin non canonique

Les récepteurs FZs et/ou les corécepteurs ROR/RYK liés à un ligand WNT peuvent également participer en l'absence des LRP5/6 à la voie de signalisation WNT/ β -catenin indépendamment de la β -catenin : on parle alors de voie de signalisation WNT/ β -catenin non canonique. Les voies de signalisation les plus étudiées sont la voie de la Planar cell polarity (PCP) et la voie WNT-Calcium (WNT/ Ca^{2+}) (Kikuchi, Yamamoto, et Sato 2009).

Figure 3.6 : Multiples voies de signalisation WNT/ β -catenin



Issu de (Kikuchi, Yamamoto, et Sato 2009).

Comme la voie canonique, ces deux voies non canoniques sont activées par les mêmes événements initiaux: l'interaction d'un ligand WNT avec son récepteur apparenté FZ, suivie de l'activation de l'effecteur cytoplasmique DVL. La majorité des recherches sur ces voies a été effectuée chez des animaux bilatéraux tels que la drosophile et le xénope (Croce et McClay 2008).

La voie de signalisation WNT/PCP

La voie PCP a été découverte chez la drosophile. Cette voie de signalisation est nécessaire à l'établissement de la polarité des cellules au cours du développement. Les cellules polarisées interviennent dans la migration et la division cellulaires qui sont essentielles pour la morphogenèse (Barrow 2006).

Les acteurs de la voie de signalisation WNT/PCP

Le ligand WNT va se lier à son récepteur FZ. La protéine DVL est engagée pour initier le signal. Des membres de la famille des petites protéines G sont recrutés (RHOA et RAC) afin de convertir en dynamique cytosquelettique de l'actine le signal PCP (W. Wang et al. 2015). Ces mêmes protéines vont activer la transcription de la Junk-kinase (JNK) et de la Yes-associated protéine YAP/TAZ. Les protéines YAP/TAZ sont responsables de l'allongement du cytosquelette induisant des contraintes d'étirement mécaniques de la cellule souvent reliées à la croissance cellulaire. La protéine JNK fait partie de la voie de signalisation Map-Kinase qui régule la dynamique cytosquelettique de l'actine et le mouvement cellulaire directionnel (Masaru Katoh 2005; Kikuchi, Yamamoto, et Sato 2009). La relation avec des gènes impliqués dans la polarité primaire et la cascade Fz/DVL impliquée dans les PCP reste cependant obscure. Des hypothèses incluent cependant en tant que gènes cibles de la voie WNT/PCP : la protéine membranaire Strabismus (STBM), la protéine du domaine LIM, la protéine *prickle* *espinas testin* (PK) et la cadhérine à sept domaines transmembranaire Flamingo (FMI) (Taylor et al. 1998; David Gubb et al. 1999; Chae et al. 1999; Habas, Kato, et He 2001).

Les récepteurs RTK, tels que ROR1, ROR2 et RYK, ayant pour ligand des WNTs, appartiennent également à la voie WNT/PCP. La liaison de WNT à ROR1 ou ROR2 active la cascade de signalisation PI3K-AKT (Zhang et al. 2012). La voie PI3K-AKT/mTOR est impliquée dans la signalisation intracellulaire dans la régulation du cycle cellulaire (Brotelle et Bay 2016). ROR1 et ROR2 sont des RTK atypiques qui ont une activité tyrosine kinase intrinsèque stimulant leur autophosphorylation. La signalisation WNT/PCP/RTK est impliquée dans la résistance thérapeutique et la récurrence des cancers chez l'homme (Masuko Katoh et Katoh 2017).

Voie WNT/PCP et implications chez les vertébrés

Chez la drosophile, des mutations de la voie WNT/PCP causent des désorganisations des structures cuticulaires* et/ou des structures des yeux (D. Gubb et García-Bellido 1982). Chez les vertébrés, des mutations dans des gènes de la voie WNT/PCP entraînent des dérégulations dans la polarité cellulaire et dans les processus morphogénétiques. Les anomalies de la voie WNT/PCP et les conséquences de l'invalidation de ces gènes chez les vertébrés sont résumées dans le tableau 3A (non exhaustif) :

Tableau 3A : Les anomalies de la voie WNT/PCP chez les vertébrés

Rôle	Gènes impliqués	Types de mutations	Espèces	Phénotypes	Références
Mise en place des follicules pileux	FZ3, FZ6, WNT5a	Perte de fonction	Souris	Fourrure des animaux désorganisée	(Guo et al. 2004)
Fermeture du tube neural	STBM, FZ3, FZ6, DVL1, DVL2	Perte de fonction	Souris	Tube neural des embryons non fermé	(Murdoch et al. 2001)
Elongation de l'axe A/P	STBM	Perte de fonction	Poisson zèbre	Embryon hypotrophique	(Wang et al. 2006)
Développement Osseux	ROR2	Mutations, perte de fonction	Homme	Syndrome de Robinow : anomalies de la colonne vertébrale, cardiaque, anomalies des organes génitaux	(Bokhoven et al. 2000)
Morphogenèse	ROR1, ROR2, DVL, WNT5a	Perte de fonction	Souris	Malformations embryonnaires Léthale	(Ho et al. 2012)

La voie de signalisation WNT/Ca²⁺

Les acteurs de la voie de signalisation WNT/Ca²⁺

Les premières études montrant un mécanisme spécifique, par lequel certains homologues de WNTs et de FZs signalisent via le Ca²⁺ et indépendamment de la β -catenin, proviennent d'études menées chez le poisson zèbre et le xénope (Kühl et al. 2000).

La voie WNT/Ca²⁺ induit la dynamique cytosquelettique et l'adhésion cellulaire, par le biais de la régulation du taux de calcium intracellulaire. L'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire est induite par la libération du Ca²⁺ via le réticulum endoplasmique ou un influx de Ca²⁺ entrant par l'espace extracellulaire.

La voie WNT/Ca²⁺ va initier la libération du Ca²⁺ par le réticulum endoplasmique en se liant à son récepteur FZ. La protéine DVL recrutée et en coopération avec la protéine G SEC14L2, va activer la phospholipase C (PLC) (Gong et al. 2017) qui va initier

la libération du Ca^{2+} . Le Ca^{2+} libéré du réticulum va activer en retour la Ca^{2+} /calmoduline-dependent protein kinase (CAMK2). La CAMK2 activée induit la phosphorylation et l'activation de la kinase Nemo (NLK) qui est un inhibiteur de la voie de signalisation WNT/ β -catenin canonique dans certaines cellules (Ishitani et al. 2003).

La PLC peut également activer la protéine kinase C (PKC), qui va médier un remodelage cytosquelettique et la migration des cellules (Angers et Moon 2009).

Enfin, les gènes cibles de la voie WNT/ Ca^{2+} restent encore à ce jour peu décrits. En revanche, on sait que le facteur de transcription Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) est impliqué dans la voie de signalisation WNT/ Ca^{2+} car son expression est régulée par la calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase (Calmoduline) (Scholz et al. 2016). La signalisation WNT/ Ca^{2+} possède donc en effecteur en aval la PLC, la PKC, la CAMK2 et la Calmoduline, qui sont impliquées dans divers processus cellulaires comme le remodelage tissulaire, la potentialisation des cellules et la migration des cellules (Masaru Katoh 2017).

Voie WNT/ Ca^{2+} et implications chez les vertébrés

Les effets de la voie WNT/ Ca^{2+} sont principalement retrouvés au cours du développement embryonnaire. Ils ont principalement été étudiés chez le poisson zèbre et le xénope. Des anomalies de la voie WNT/ Ca^{2+} et les conséquences de l'inactivation de ces gènes chez les vertébrés sont résumées dans le tableau 3B (non exhaustif) :

Tableau 3B : Les anomalies de la voie WNT/ Ca^{2+} chez les vertébrés

Rôle	Gènes impliqués	Types de mutations	Espèces	Phénotypes	Références
Mise en place de l'axe dorso/ventral	WNT5	Perte de fonction	Poisson zèbre Xénope	Hyperdorsalisation des embryons	(Saneyoshi et al. 2002; Westfall et al. 2003)
Formation des muscles squelettiques : myoblastes	WNT5a CAMK2	Gain de fonction	Oiseau	Malformations de l'aile	(Anakwe et al. 2003)
Suppresseur de tumeurs	WNT5A PKC	Gain de fonction	Lignées cellulaires humaines	Augmentation de l'invasion tumorale des mélanomes	(Weeraratna et al. 2002)
Suppresseur de tumeur	WNT5A	Gain de fonction	Souris	Tumeur hématopoïétique	(Liang et al. 2003)
Stabilisation de l'angiogenèse et de la vascularité	RSPO3 Ca ²⁺ NFAT	Perte de fonction	Souris	Léthal Malformations des microvaisseaux	(Scholz et al. 2016)
Oncogène	FZ8	Perte de fonction	Lignées cellulaires humaines	Augmentation de la malignité des tumeurs	(Wang et al. 2015)

La voie WNT/ β -catenin et les cellules souches

La voie de signalisation WNT/ β -catenin canonique ou non canonique est impliquée dans divers événements biologiques. La recherche au cours des dernières décennies a pu décortiquer les différents événements moléculaires de cette voie de signalisation afin de mieux comprendre son rôle dans l'homéostasie des organismes et ses dérégulations dans les pathologies et cancers (Angers et Moon 2009). Plus particulièrement, la voie WNT/ β -catenin canonique, lorsque cette voie fonctionne dans une régulation homéostatique au cours de l'embryogenèse et chez l'adulte, régule le destin, la prolifération, et l'auto-renouvellement cellulaires des cellules souches et des cellules progénitrices. La moindre dérégulation homéostatique, traduite par une hyperactivité ou une hypoactivité de la voie, a des conséquences dévastatrices sur les organismes, comme des troubles du développement, des pathologies ou des cancers (Voir pour revue (Clevers et Nusse 2012; Masuko Katoh et Katoh 2017).

Au cours de mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressée au rôle de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules germinales. Jusqu'à ce jour, cette voie de signalisation n'a jamais été étudiée dans les cellules germinales. Les cellules germinales sont des cellules souches pluripotentes particulières puisque ce sont les seules qui sont capables de réaliser la méiose.

Les cellules souches embryonnaires sont le modèle qui se rapproche le plus des cellules germinales. Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes qui expriment les mêmes marqueurs que les cellules germinales. Ainsi au cours de ce chapitre, je vais plus particulièrement m'intéresser au rôle de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules souches embryonnaires et pluripotentes et les cellules souches cancéreuses.

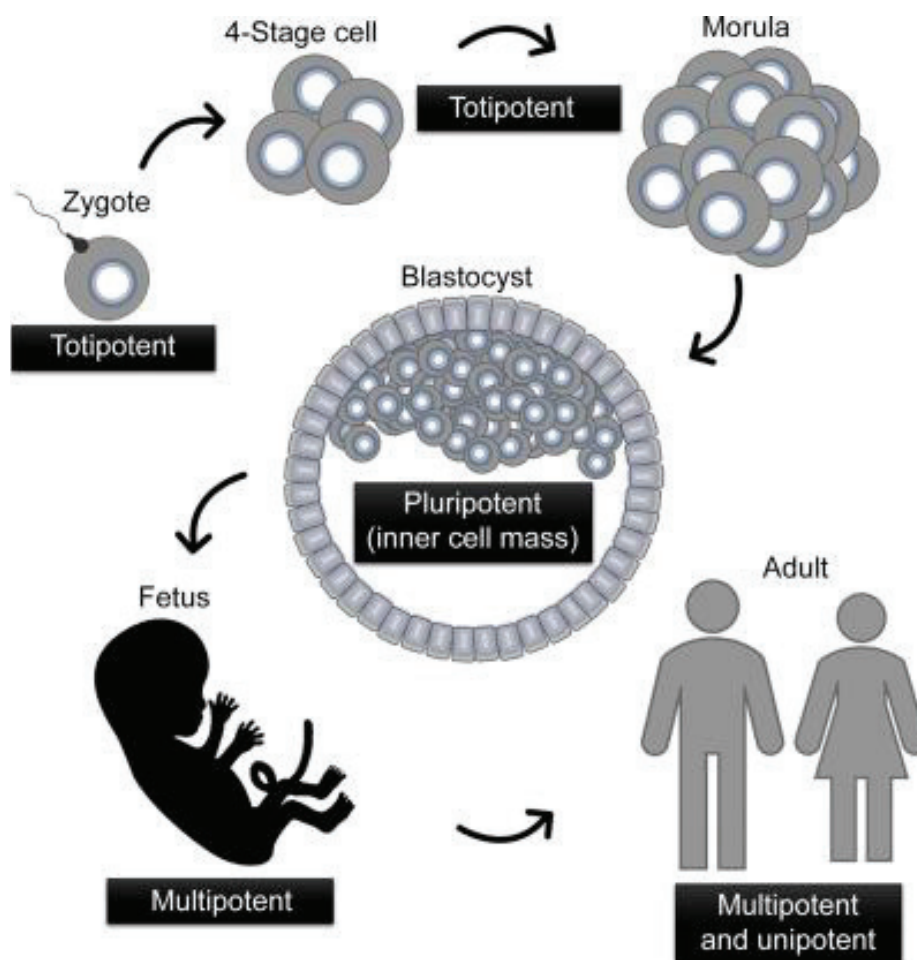
La première preuve de l'implication de la voie WNT/ β -catenin dans la biologie des cellules souches adultes a été apportée dans les années 1990 chez la souris. Un modèle murin perte de fonction du gène *Tfc4* entraîne la perte de cellules souches intestinales et la dégradation ultérieure de l'épithélium intestinal (Korinek et al. 1998). Depuis lors, de nombreuses études ont montré que la voie WNT/ β -catenin est nécessaire dans la plupart, sinon tous les types de cellules souches.

Les cellules souches sont un type de cellules non spécialisées définies sur leurs propriétés comme leur capacité à se renouveler elles-mêmes, leurs divisions illimitées et leur

potentiel de différenciation en cellules plus spécialisées (voir pour revue (Łos, Skubis, et Ghavami 2019)).

Elles sont à la base de l'homéostasie des tissus et de la régénération des organismes. Le développement d'un organisme passe irréversiblement de l'embryon à l'adulte, les cellules passant d'un stade souche à un stade différencié progressivement en phénotypes finaux spécialisés. Les cellules souches sont présentes dans l'embryon dès les premiers stades de la fécondation et sont à l'origine de tous les tissus de l'organisme (Figure 3.7).

Figure 3.7 : Robustesse des cellules souches



Issu de (Łos, Skubis, et Ghavami 2019).

Les cellules souches sont classées dans différentes catégories en fonction leur plasticité et/ou de leur potentiel de régénération : Totipotentes, Pluripotentes, Multipotentes, Oligopotentes et Unipotentes.

Au cours de l'embryogenèse, après la fécondation (fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle), le zygote va se diviser pour donner le stade 4 cellules puis le stade morula. A ces stades, les cellules sont dites Totipotentes, elles ont la capacité de se différencier en lignées cellulaires à partir des trois couches germinales : mésoderme*, endoderme* et ectoderme*, et en tissus extra-foetaux (placenta). Pendant les divisions, se forme, après le stade morula, un

blastocyste. Les cellules composant la masse cellulaire interne du blastocyste (MCI) ont des propriétés de pluripotence. Ces cellules souches ont la capacité de se différencier en cellules des trois couches germinales, à l'exception des tissus extra-fœtaux. Les cellules souches multipotentes se différencient en un nombre limité de types de cellules provenant de la même couche germinale. Enfin les cellules oligopotentes peuvent se différencier en quelques types de cellules et les cellules unipotentes ont la capacité à produire des cellules de leur propre type cellulaire.

Les cellules souches sont aussi caractérisées en fonction de leur origine. On distingue trois grands types cellulaires de cellules souches : les cellules souches embryonnaires, qui sont isolées au stade du développement embryonnaire, des cellules souches adultes, situées dans les organes adultes et un autre type de cellules souches, les iPS (Induced pluripotent stem cells). Les iPS sont générées et programmées à partir de cellules somatiques et ont des propriétés similaires à celles des cellules souches embryonnaires. Les types de cellules souches avec leur source indiquée, les propriétés caractéristiques et les marqueurs d'identification les plus importants sont présentés dans le tableau 3C.

Tableau 3C : Les différents types de cellules souches

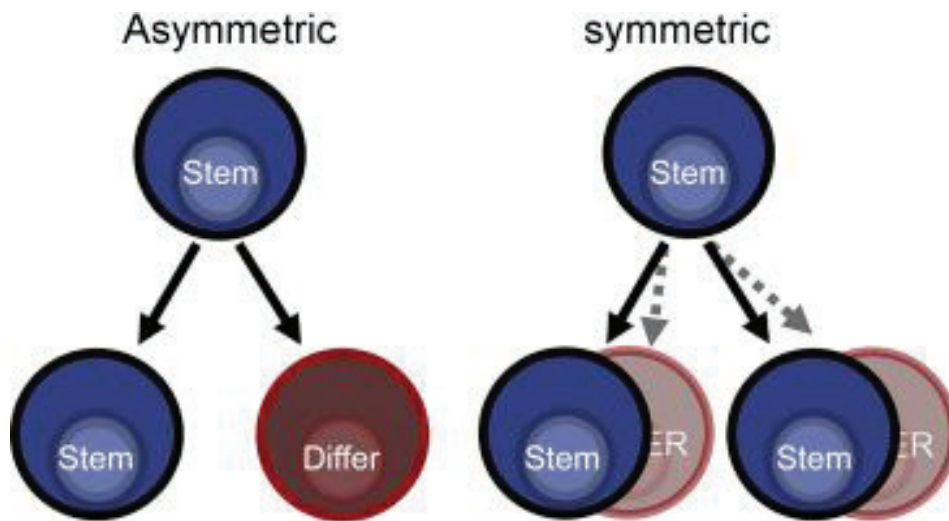
<u>Nom</u>	<u>Source</u>	<u>Caractéristiques</u>	<u>Marqueurs</u>
Cellules souches embryonnaires (ESC) (Evans et Kaufman 1981)	Blastocytes	- Pluripotence - Prolifération illimitée - Risque de formation de tératome lors de l'injection à l'état indifférencié	CD133, CD31, CD59, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, Oct3/4, Sox2, KLF-4, Nanog, TRA-1-60, TRA-1-81
Cellules souches adultes (ASC)	Tissu adipeux Tissu hématopoïétique Peau Tissu intestinal	- Multipotence - Risque faible/nul de formation de tumeur - Nombre limité dans le tissu	HSC: c-Kit, CD34, Sca-1 Thy-1, CD133 MSC: CD90, CD105, CD73, CD44, CD117, STRO-1
Cellules souches pluripotentes induites (iPS) (Takahashi et Yamanaka 2006)	Cellules somatiques : fibroblastes, kératinocytes, ...	- Pluripotence - Obtenues par reprogrammation de cellules somatiques - Risque de formation de tératome lors de l'injection à l'état indifférencié	Oct3/4, Nanog, Dax1, Ras, Zfp296

Source (Łos, Skubis, et Ghavami 2019).

De plus, les cellules souches peuvent se répliquer par deux types de divisions cellulaires :

- 1) Symétrique : les deux cellules filles sont identiques aux cellules souches mères ;
- 2) Asymétrique : une cellule sur deux est identique aux cellules souches mères et la seconde entre en différenciation pour donner naissance à des cellules plus spécialisées.

Figure 3.8 : Prolifération symétrique et asymétrique des cellules souches



Issu de (Łos, Skubis, et Ghavami 2019).

Où et quand la voie WNT/ β -catenin intervient-elle dans les cellules souches ?

La capacité d'auto-renouvellement des cellules souches* tout en produisant des cellules spécialisées est dictée par des signaux extrinsèques. Les protéines des familles BMP, Hedgehog, Notch sont connues pour participer à cette activité extrinsèque. Ces signaux extrinsèques et les cellules qui les produisent constituent une niche, ou centre de signalisation, qui a un faible rayon d'action, capable de limiter le nombre de cellules souches (Losick et al. 2011).

La voie WNT/ β -catenin s'insère particulièrement bien dans cette définition bien qu'elle se distingue car elle a une capacité d'étendre son activité. La voie WNT/ β -catenin participe à un éventail d'effets sur les cellules cibles. Le rôle de WNT/ β -catenin dans le maintien des cellules souches a suscité un intérêt particulier.

Dans le follicule pileux, la signalisation WNT/ β -catenin joue plusieurs rôles dans la biologie des cellules souches et des progéniteurs. Le follicule pileux est un mini-organe complexe qui passe par des phases répétitives de repos (télogène), de croissance (anagène) et de destruction (catagène) tout au long de la vie. Le follicule pileux possède une niche de cellules souches adultes qui participent activement au cycle de vie du follicule et à la régénération de la peau (M. R. Schneider, Schmidt-Ullrich, et Paus 2009).

Des expériences de traçage cellulaire chez la souris ont permis de mettre en évidence que les acteurs de la voie WNT/ β -catenin et plus particulièrement le gène *Axin2* sont exprimés dans cette niche cellulaire. De plus les modèles murins perte de fonction ou gain de fonction des différents acteurs (*Dkk/Wls*/ β -catenin) ont permis de mettre en évidence que la voie WNT/ β -catenin est active dans les cellules souches lors des phases de repos et qu'elle est inhibée pour laisser les cellules se différencier en phase anagène (Lim et al. 2016).

Au cours de ces dernières années, l'identification des gènes *Lgr5* et *Axin2* (deux gènes cibles de WNT/ β -catenin, codant eux-mêmes des composants de la voie WNT/ β -catenin) a permis la création d'outils génétiques puissants pour le traçage par lignage d'une multitude de cellules souches adultes connues et nouvelles.

En 1887, Paneth a observé des petites cellules cycliques à la base des cryptes de l'intestin grêle qui ont ensuite été identifiées comme les cellules souches intestinales exprimant LGR5 (H. Cheng et Leblond 1974). La génération d'un modèle murin *CreERT2* spécifique au locus *Lgr5* a démontré par traçage cellulaire que les cellules souches LGR5-positives ont un cycle constant et elles sont alors identifiées comme des cellules souche adultes multipotentes (Barker et al. 2007).

La même stratégie de traçage cellulaire (*Lgr5-CreERT2* ou *Axin2-CreERT2*) a permis de démontrer que LGR5 ou AXIN2 marquaient les cellules souches de nombreux autres tissus comme le follicule pileux (Jaks et al. 2008), l'estomac (Barker et al. 2010), le pancréas (Huch, Bonfanti, et al. 2013), le foie (Huch, Dorrell, et al. 2013; B. Wang et al. 2015), le rein (Barker et al. 2012), l'épithélium ovarien (Ng et al. 2014), et la glande mammaire (Visser et al. 2012; Plaks et al. 2013).

Ainsi, il existe un concept fondamental selon lequel les cellules souches sont intrinsèquement destinées à se différencier. Il semble que les signaux WNT/ β -catenin pourraient bloquer ou réguler le timing de l'étape de différenciation des cellules, éventuellement en supprimant l'expression des gènes spécifiques à la différenciation (Clevers et Nusse 2012).

Tableau 3.D : Résumé d'études sélectionnées démontrant les effets de la signalisation WNT/ β -catenin sur les cellules souches provenant de différents tissus.

Stimulus	Type cellulaire	Espèces	Effet	Modèle	Référence
<u>Cellules souches de l'épiderme et les progéniteurs</u>					
Gain de fonction β -catenin	Kératinocytes	Souris	Inhibition de la différenciation	<i>in vitro</i>	(A. J. Zhu et Watt 1999)
Gain de fonction β -catenin	Cellules souche du follicule pileux	Souris	Formation de tumeurs de la peau	<i>in vivo</i>	(Gat et al. 1998)
Perte de fonction conditionnelle de β -catenin	Cellules souches du follicule pileux	Souris	Accélération de la pousse des poils	<i>in vivo</i>	(Huelsken et al. 2001)
<u>Cellules souches de l'intestin et les progéniteurs</u>					
Perte de fonction Tcf4 ^{-/-}	Cellules souches intestinal	Souris	Dégradation des cryptes intestinales et perte des cellules souches	<i>in vivo</i>	(Korinek et al. 1997)
<u>Cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs</u>					
Perte de fonction conditionnelle de β -catenin	Progéniteurs des cellules T	Souris	Réduction de la prolifération, différenciation cellulaire bloquée	<i>in vivo</i>	(Hsu, Shakya, et Costantini 2001)
Wnt5a	Cellules souches de la moëlle épinière	Homme	Augmentation de la régénération de la moëlle	<i>in vivo</i> (Xenogreffe)	(B. Murdoch et al. 2003)
<u>Cellules souches neuronales et progéniteurs</u>					
Perte de fonction conditionnelle de β -catenin	Progéniteurs neuronaux	Souris	Réduction de l'expansion neuronale	<i>in vivo</i>	(Zechner et al. 2003)
Gain de fonction conditionnel de β -catenin	Progéniteurs neuronaux	Souris	Augmentation de l'expansion neuronale	<i>in vivo</i>	(Zechner et al. 2003)
<u>Cellules souches embryonnaires ESC</u>					
Chiron (inhibition de GSK3 β)	ESC	Souris/Homme	Maintien de la pluripotence des cellules	<i>in vitro</i>	(N. Sato et al. 2004)
Mutations APC	ESC	Souris	Augmentation de la différenciation cellulaire	<i>in vitro/in vivo</i>	(Kielman et al. 2002)

Issu de (Reya et Clevers 2005).

Premières observations du rôle de la voie WNT/ β -catenin dans le maintien de l'état de pluripotence des cellules souches

La connexion entre la voie WNT/ β -catenin et le maintien de l'état souche des cellules souches a été identifiée il y a une dizaine d'années notamment avec le besoin de recourir *in vitro* à l'utilisation de protéines WNT recombinantes ou d'agonistes de la voie WNT/ β -catenin pour maintenir les cellules souches en culture. En effet, les cultures primaires de cellules souches adultes sont difficiles à développer dans un état de renouvellement automatique. Dans différentes études, l'ajout de WNTs au milieu de culture a permis de surmonter certains de ces problèmes.

Ainsi, à partir de cellules souches exprimant *Lgr5* prélevées dans l'intestin de souris, des organoïdes crypto-viliaires* peuvent être cultivés et formés, en co-culture avec des cellules Paneth*. Ces cellules expriment des signaux extrinsèques TGF α , NOCTH et WNT3, signaux essentiels au maintien des cellules souches en culture (T. Sato et al. 2009).

Dans la glande mammaire de souris, des essais de transplantation ont mis en évidence l'existence d'une population rare de cellules souches mammaires (MaSC) capables de reconstituer une glande mammaire fonctionnelle. L'ajout de la protéine WNT3a dans la culture des MaSC permet de les maintenir dans un état indifférencié et d'établir une lignée de cellules souches MaSC multipotentes et proliférantes. Les MaSC conservent en activant la voie WNT/ β -catenin leur capacité d'auto-renouvellement (Zeng et Nusse 2010).

Enfin, les signaux WNTs paracrines et autocrines sont des facteurs essentiels d'auto-renouvellement pour les cellules souches embryonnaires et ils sont nécessaires pour empêcher leur différenciation en EpiSC en culture. L'ajout de WNT3a ou de CHIR dans le milieu de culture des cellules souches embryonnaires favorise le maintien de l'état de pluripotence (N. Sato et al. 2004; Berge et al. 2011).

Mécanismes moléculaires associés à la voie WNT/ β -catenin dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires de souris

Les gènes de pluripotence *Pou5f1* (*Oct3/4*) et *Nanog* codant des facteurs de transcription nécessaires pour maintenir l'auto-renouvellement, sont utilisés comme rapporteurs de l'état de pluripotence des cellules souches embryonnaires (Kielman et al. 2002; N. Sato et al. 2004; Takahashi et Yamanaka 2006; Pelosi, Forabosco, et Schlessinger 2011; Nichols et Smith 2011; Berge et al. 2011; Kelly et al. 2011).

Parmi les gènes régulateurs en aval de *Pou5f1* et *Nanog*, figure *Tcf3*. Le gène *Tcf3* (*TCF7L1* chez l'Homme) code pour un facteur de transcription contenant un domaine HMG appartenant à la famille TCF/LEF, des molécules effectrices de signalisation WNT/ β -catenin. Plus particulièrement, la protéine TCF3 possède un domaine de liaison à la β -catenin et il a été montré qu'il joue un rôle activateur dépendant de la β -catenin dans la transcription de gènes cibles et un rôle répresseur indépendant de la β -catenin (Molenaar et al. 1996; Brannon et al. 1997; Merrill et al. 2001).

En utilisant des cellules souches embryonnaires de souris en culture dont les deux allèles de *Tcf3* (*Tcf3*^{-/-}) ont été éliminés, il a été montré que l'absence de *Tcf3* stimule l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires. Ainsi, *Tcf3* limite la capacité de *Nanog* et *Pou5f1* à activer des gènes cibles qui favorisent l'auto-renouvellement, tout en étant également

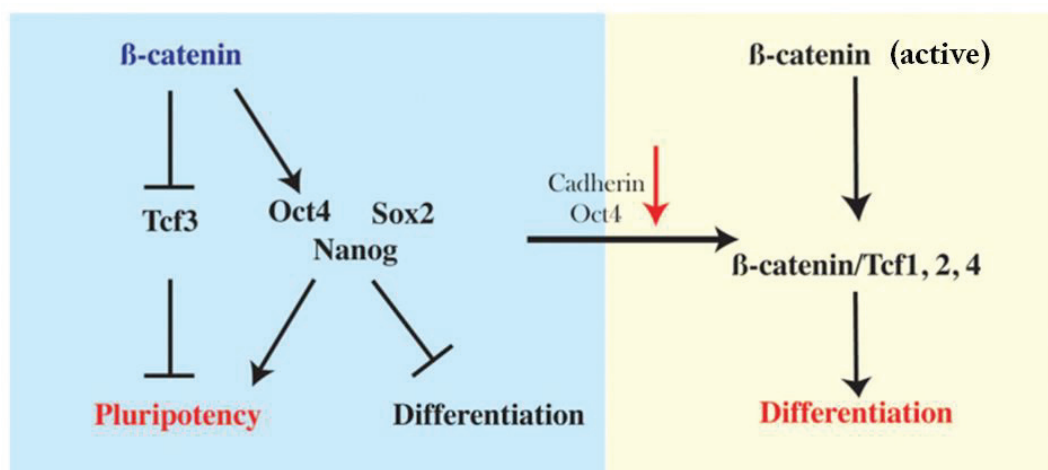
régulé par *Pou5f1* et *Nanog*. *Tcf3* fonctionne comme un limitateur des circuits de transcription nécessaires à l'auto-renouvellement de cellules pluripotentes (Yi, Pereira, et Merrill 2008).

Ainsi le maintien de la pluripotence dans les cellules souches embryonnaires de souris repose sur l'activité d'un réseau de transcription alimenté par l'activité de trois facteurs de transcription (*Nanog*, *Pou5f1* et *Sox2*) et équilibré par l'activité répressive de *Tcf3*. D'autres études présentent une possible connexion entre la signalisation WNT/ β -catenin et la pluripotence. TCF3 peut en effet se lier aux mêmes régions régulatrices que POU5F1 et NANOG, et entraîner une perte de pluripotence (Cole et al. 2008; G. Guo et al. 2011; Kelly et al. 2011).

Dans ce modèle, la fonction de β -catenin semble être d'antagoniser l'activité répressive de *Tcf3* sur les régulateurs clés de la pluripotence d'une manière qui n'exige pas son activité de transcription (Yi et al. 2011; Kelly et al. 2011). En effet, il est prouvé depuis une dizaine d'années que les inhibiteurs de la GSK3 β favorisent la pluripotence par l'intermédiaire de la β -catenin mais ils ne fournissent aucune information sur l'état de la protéine β -catenin dans les cellules souches embryonnaires. De nombreuses études ont montré que la signalisation WNT/ β -catenin est également requise pour la différenciation des cellules souches (Gadue et al. 2006; Lindsley et al. 2006; Hansson et al. 2009; Jackson et al. 2010).

De manière intéressante, il a été montré plus récemment que β -catenin, mais pas son activité transcriptionnelle, est nécessaire au maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires de souris (Faunes et al. 2013). En effet, lorsque les cellules souches embryonnaires sont placées dans un milieu favorisant la différenciation des cellules souches embryonnaires en neurones, iCRT3, un inhibiteur pharmacologique de l'interaction entre la β -catenin et les TCFs qui interfère avec l'activité de transcription du complexe (Gonsalves et al. 2011), n'a aucun effet sur l'expression de POU5F1 et NANOG (Faunes et al. 2013). En conditions d'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires en présence de CHIR, POU5F1 et β -catenin forment un complexe à la membrane des cellules souches embryonnaires (CDH1 étant présent dans le complexe). La réduction des taux de β -catenin dans les cellules souches embryonnaires : $\beta cat^{F/F}$ et $TCF3^{-/-}$ entraîne une diminution de la pluripotence et une fréquence accrue de différenciation, indiquant que la β -catenin a des rôles dans la pluripotence qui s'ajoutent à l'activité répressive de TCF3. Ces résultats suggèrent que la protéine β -catenin contribue à la pluripotence non seulement en titrant l'activité de TCF3 (Wray et al. 2011), mais également en favorisant la formation de complexes β -catenin-OCT3/4(POU5F1) associés à la membrane.

Figure 3.9 : Mécanisme de régulation de la pluripotence par la β -catenin



Issu de (Faunes et al. 2013).

Pour résumer, dans des modèles *in vitro* de cellules souches embryonnaires, une dynamique compétitive de complexes protéiques constitués des facteurs de pluripotence et de β -catenin est un déterminant de la pluripotence. La fonction principale de la β -catenin est de réguler ces ratios et ainsi de permettre un phénotype d'auto-renouvellement très robuste des cellules souches embryonnaires (Arias et Hayward 2006).

Les dérégulations dans les cellules souches de la voie WNT/ β -catenin entraînent des cancers

La signalisation WNT/ β -catenin est souvent active et nécessaire pour la biologie des cellules souches adultes, et il n'est donc pas surprenant que des mutations de la voie WNT/ β -catenin soient fréquemment observées dans les cancers, notamment dans les tissus qui dépendent normalement de WNT/ β -catenin pour l'auto-renouvellement. Une signalisation WNT/ β -catenin (canonique et non canonique) aberrante est fréquemment à l'origine de différentes tumeurs humaines, telles que les cancers du sein, les cancers colorectaux, ovariens, pancréatiques, de l'utérus, la leucémie, le mélanome, etc.

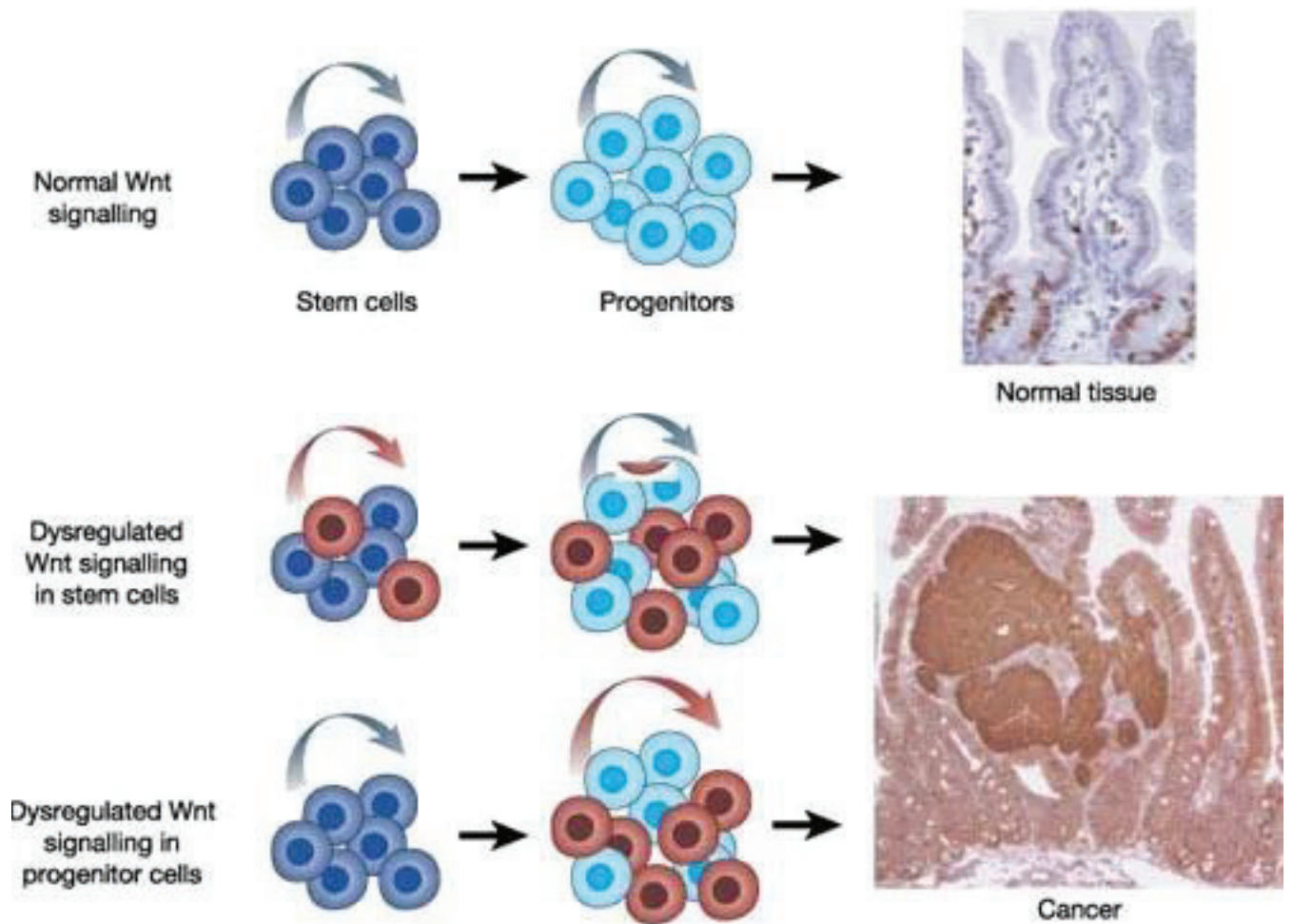
Ainsi, la plupart des cancers du côlon présentent des mutations sur le gène *APC* (Nishisho et al. 1991). La perte de fonction de l'APC conduit à une stabilisation inappropriée de la β -catenin qui entraîne une surexpression de la voie WNT/ β -catenin. La plupart des cas de cancer colorectal résultent de la perte des deux allèles APC (Kinzler et Vogelstein 1996). Chez ces patients *APC*^{-/-}, la β -catenin va former des complexes constitutifs avec TCF4 qui favorise la prolifération des cellules souches intestinales (Korinek et al. 1997; 1998). Le gène *AXIN2* peut être aussi muté dans de rares cas de cancers colorectaux (W. Liu et al. 2000). Des mutations

ponctuelles induisant la perte de résidus régulateurs N-terminaux de la β -catenin vont empêcher sa dégradation par le complexe protéique (Morin et al. 1997).

Des mutations perte de fonction du gène *AXIN2* ont également été observées dans les carcinomes hépatocellulaires ainsi que des mutations gain de fonction du gène *CTNNB1* dans le cancer du côlon et le mélanome (Rubinfeld et al. 1997).

Plus récemment, des mutations perte de fonction dans les gènes *RNF43* et dans *ZNRF3* ont été décrites pour la première fois dans le cancer du pancréas (J. Wu et al. 2011) et dans le carcinome corticosurrénalien (Assié et al. 2014).

Figure 3.10 : La voie de signalisation WNT/ β -catenin et les cellules souches cancéreuses



Issu de (Reya et Clevers 2005).

Les dérégulation des signaux WNT/ β -catenin peuvent directement favoriser la prolifération de cellules souches cancéreuses par une régulation à la hausse des gènes cibles induisant la prolifération et la capacité d'auto-renouvellement (Seshagiri et al. 2012; Yan et al. 2017). De plus, la signalisation canonique WNT/ β -catenin dans les cancers à cellules souches induit l'expression et la sécrétion de facteurs de croissance, tels que les FGF, KIT et le VEGF, qui modifient le microenvironnement tumoral (Masuko Katoh et Katoh 2017).

L'ensemble de ces résultats indique que la signalisation WNT/ β -catenin est impliquée dans le maintien et la survie des cellules souches cancéreuses, l'expansion tumorale et les métastases par des effets directs sur les cellules souches elles-mêmes et par des effets indirects via des interactions cellules/stroma/ système immunitaire (voir pour revue (Masaru Katoh 2017)).

Chapitre 4 – La voie WNT/ β -catenin dans l’ovaire en développement

Historique

Depuis les travaux d’Alfred Jost en 1951, il était admis que le développement ovarien était l’état "par défaut", c'est-à-dire se produisant en l'absence du chromosome Y et du gène *SRY*. Toutefois, depuis les années 2000, le dogme d'une voie « par défaut » conditionnant le développement ovarien a été remis en question. Des mutations génétiques conduisant à la masculinisation de gonades XX ont été décrites malgré l'absence de mutations activatrices de gènes « mâles » chez des patients XX humains (Parma et al. 2006; Mandel et al. 2008), chez la souris (Vainio et al. 1999; Auguste et al. 2011) et chez la chèvre (Pailhoux et al. 2001).

Dans la plupart de ces études, les mutations affectent la voie de signalisation WNT/ β -catenin, une voie de signalisation très exprimée contrôlant différentes étapes de l'organogenèse des mammifères et de l'homéostasie des organes à l'âge adulte (Niehrs 2012). *R-spondin1* est identifié en 2004 comme étant un agoniste de la signalisation WNT/ β -catenin (Kazanskaya, Glinka, Barrantes, et al. 2004) et en 2006, il est démontré qu'il est un nouveau facteur clé impliqué dans la différenciation ovarienne chez l'Homme (Parma et al. 2006) et chez la souris (Chassot et al. 2008a). De plus, le laboratoire de Blanche Capel montre que la stabilisation de l’expression de β -catenin dans des gonades XY d'embryons de souris favorise le développement ovarien dans une gonade programmée pour devenir un testicule (Maatouk et al. 2008). Précédemment, le même laboratoire avait déjà prouvé que le ligand WNT4 était nécessaire au maintien de la voie femelle en jouant un rôle antagoniste de la voie de la différenciation mâle (Kim et al. 2006).

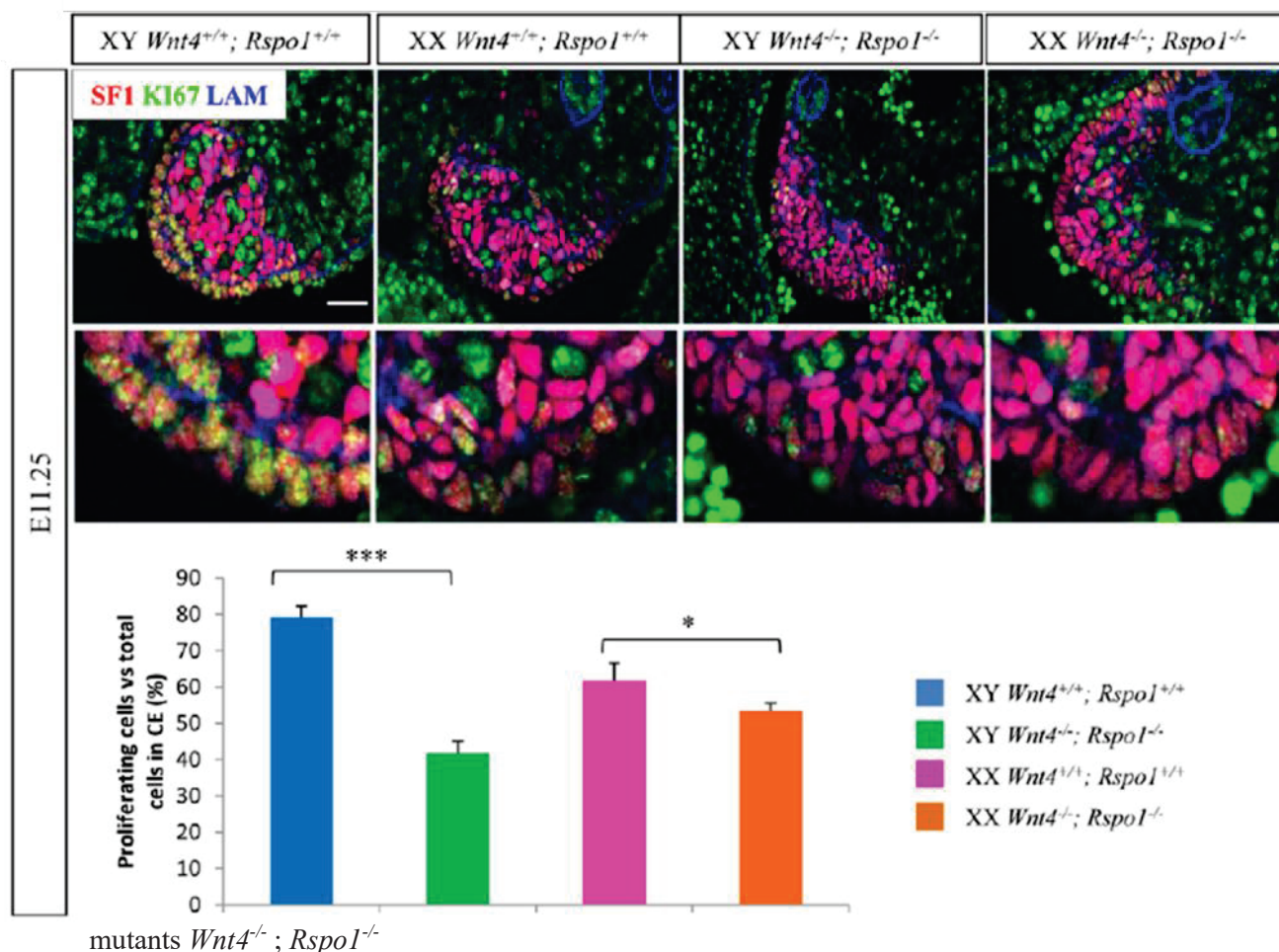
Ces différents résultats montrent que la signalisation WNT/ β -catenin est fermement établie comme étant une voie de signalisation clé contrôlant la différenciation femelle.

Dans ce chapitre, je vais faire l’état des lieux de ce que nous savons sur le rôle de β -catenin au cours du développement de la gonade femelle et plus particulièrement dans chaque type cellulaire, les cellules somatiques et les cellules germinales.

R-spondin1 et *Wnt4* dans la formation de la gonade bipotentielle

Au cours du développement de la gonade bipotentielle, la prolifération des progéniteurs somatiques est une étape cruciale de la morphogenèse de cet organe. Les gènes *Rspo1* et *Wnt4* participent à la prolifération de l'épithélium cœlomique. L'inactivation génétique de ces deux gènes chez la souris (*Rspo1*^{-/-};*Wnt4*^{-/-}) provoque chez les embryons XX et XY une diminution significative de la prolifération des progéniteurs de l'épithélium cœlomique entre 10.5 et 11.5 *jpc* (Chassot et al. 2012).

Figure 4.1 : La prolifération des progéniteurs de l'épithélium cœlomique est réduite dans les



Issu de (Chassot et al. 2012).

Le défaut de prolifération observé chez les mutants *Rspo1*^{-/-};*Wnt4*^{-/-} est indépendant du sexe de l'embryon. Cependant ce phénotype est plus gravement altéré chez les embryons XY et conduit au développement d'un testicule hypoplasique (Chassot et al. 2012).

Naturellement, dans les embryons XX, les cellules de la pré-granulosa présentent un niveau de prolifération inférieur aux embryons XY. En effet, dans ces cellules, l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que *p21kip1*, *p57kip1* et *p27kip1* est stimulée à partir de 11.5 *jpc* (Cederroth et al. 2007). De plus, la prolifération des progéniteurs XY présents dans l'épithélium cœlomique est activée suite à l'expression de *Sry* et de ses effecteur en aval, entraînant une augmentation de la taille du testicule (Schmahl et al. 2000; 2004).

RSPO1 et WNT4 sont respectivement un agoniste et un ligand de la voie WNT/ β -caténine comme décrit dans le Chapitre 3 : « La voie de signalisation WNT/ β -catenin ». Le gène cible rapporteur universel de la signalisation de WNT/ β -catenin, *Axin2*, est exprimé dans l'épithélium cœlomique de la gonade bipotentielle chez les embryons XY et XX à 11.5 *jpc*. Ainsi WNT4 et RSPO1 pourraient activer la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique par la signalisation canonique WNT/ β -catenin (Chassot et al. 2012). De plus, le récepteur LGR5 et le co-récepteur LRP4 (respectivement, récepteurs de RSPO1 et des WNTs) sont fortement exprimés dans les cellules progénitrices somatiques XY (Jameson et al. 2012). Cependant, aucune démonstration formelle, par des études fonctionnelles, de la nature des récepteurs potentiels n'a été réalisée dans la gonade, et l'existence de la synergie de WNT4 et RSPO1 reste une question ouverte dans cet organe.

R-spondin1 et *Wnt4* dans la différenciation sexuelle somatique

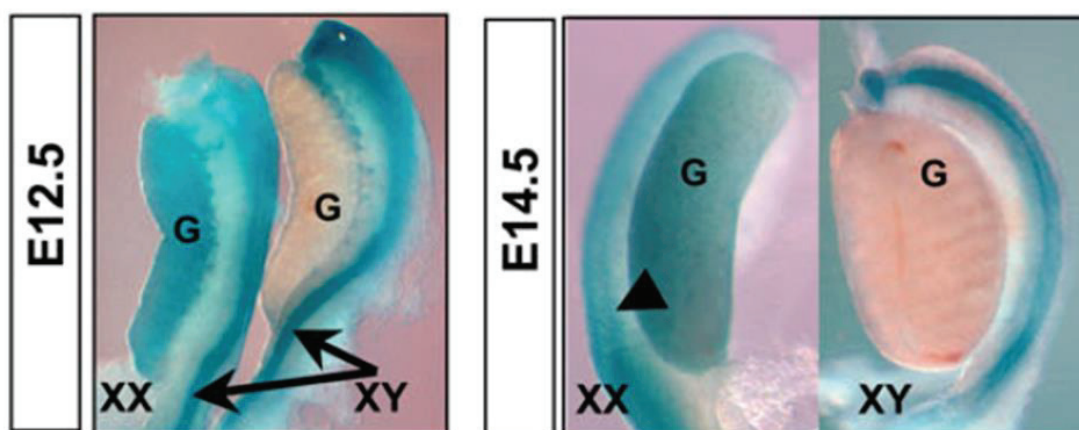
Rspo1 et *Wnt4* sont exprimés indifféremment du sexe à 10.5 et 11.5 *jpc* dans la gonade bipotentielle. A 12.5 *jpc*, l'expression des deux gènes devient spécifique de l'ovaire (Vainio et al. 1999; Chassot et al. 2008a). Plus précisément, RSPO1 et WNT4 sont sécrétés par les cellules somatiques de l'ovaire et RSPO1 est détectée à la membrane des cellules somatiques et germinales à 12.5 et 14.5 *jpc* (Kocer et al. 2008; Smith et al. 2008).

A 12.5 *jpc*, dans la gonade *Rspo1*^{-/-}, l'expression de *Wnt4* est supprimée alors que l'expression de *Rspo1* est maintenue dans la gonade *Wnt4*^{-/-} (Chassot et al. 2008a; Tomizuka et al. 2008). Ces résultats suggèrent que la signalisation RSPO1/WNT/β-catenin favorise le maintien de l'expression de *Wnt4*, lui-même cible de cette voie de signalisation.

Le gène *Ctnnb1* est suffisant pour induire la différenciation ovarienne.

L'utilisation du modèle murin rapporteur *Axin2-LacZ* (permettant l'expression de la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur d'*Axin2* cible de la voie WNT/β-catenin) ainsi que les études transcriptomiques ont mis en évidence que la signalisation WNT/β-catenin est activée de manière spécifique du sexe dans les cellules somatiques et germinales de l'ovaire à 12.5 *jpc* (Chassot et al. 2008b; 2011; Jameson et al. 2012).

Figure 4.2 : Expression d'*Axin2*, rapporteur de la voie WNT/β-catenin dans les gonades du



modèle murin *Axin2-LacZ*

Canonical β-catenin signaling is specifically activated in female gonads. X-Gal whole-mount staining of *Axin2*^{+/+}/*LacZ* urogenital ridges (magnification X20). Blue staining reflecting β-galactosidase activity was observed in XX gonads, whereas XY gonads remained unstained. Arrows and arrowhead show the Wolffian ducts and Mullerian duct staining, respectively (G: gonad) (Chassot et al. 2008b).

Dans les gonades XY, la voie WNT/ β -catenin est régulée négativement. Des études *in vitro* ont mis en évidence que la protéine SRY peut antagoniser la voie WNT/ β -catenin et déclencher la dégradation de β -catenin en interagissant physiquement avec celle-ci (Bernard et al. 2008). Cette démonstration n'a pas été faite *in vivo* à ce jour.

Chez la souris, l'activation ectopique de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques XY entraîne une inversion de sexe de type femelle XY. Le développement testiculaire est perturbé et un destin ovarien est favorisé. Ces résultats montrent que *Ctnnb1* est suffisant pour induire un développement ovarien (Maatouk et al. 2008) et que la voie de signalisation WNT/ β -catenin est un déterminant femelle (Chassot et al. 2008a), déconstruisant ainsi la notion de développement ovarien "par défaut".

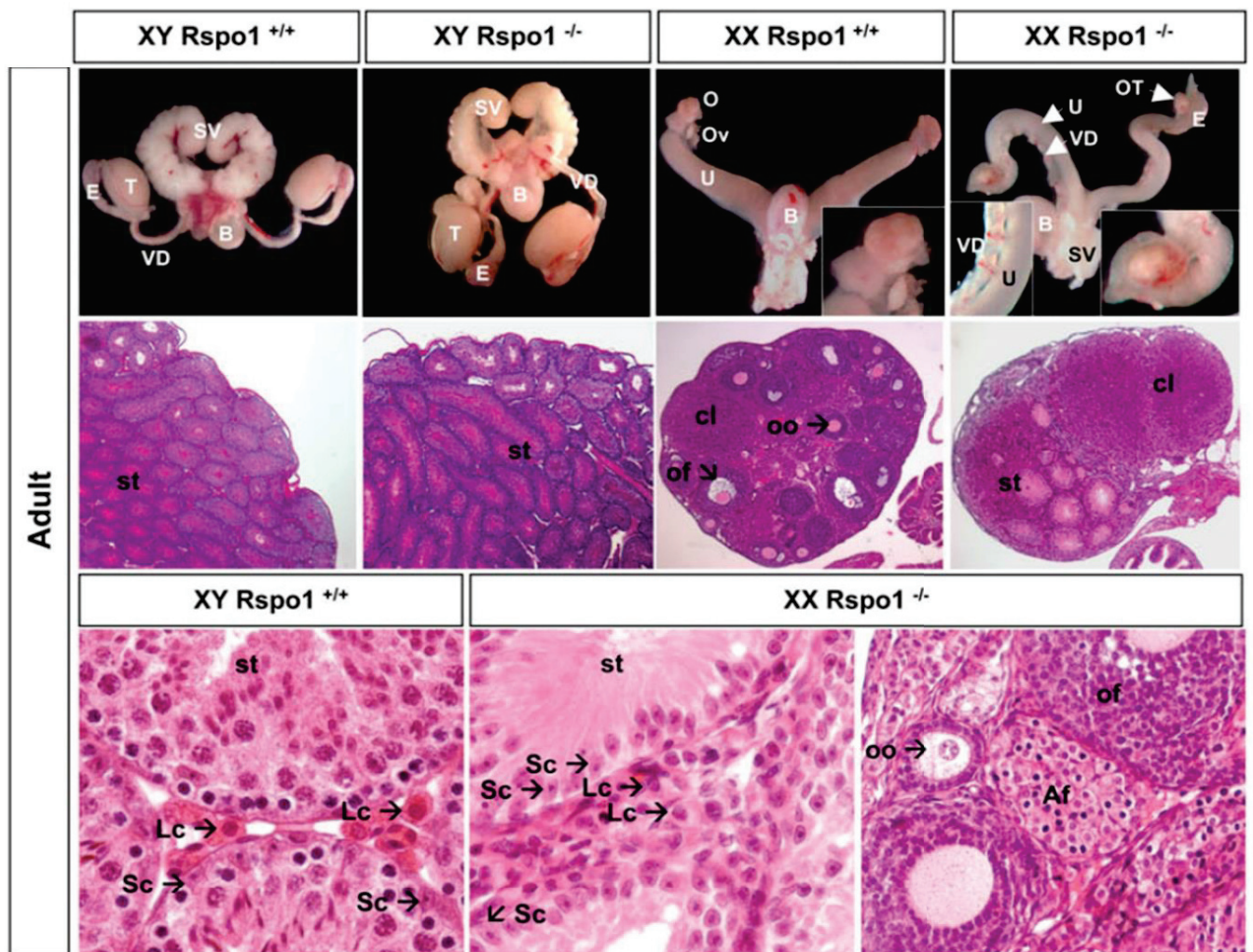
L'étude du modèle murin perte de fonction conditionnelle de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques XX (au moyen de la Cre Recombinase *Sfl-Cre*) n'a cependant pas montré d'inversion de sexe de type mâle XX comme attendu. L'absence de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques (à partir du moment où elles expriment SF1, soit à 11.5 *jpc*) n'altère pas la différenciation ovarienne (C.-F. Liu et al. 2008). Ces résultats suggèrent soit que *Ctnnb1* doit être invalidé dans toutes les cellules de la gonade et/ou de manière plus précoce pour favoriser l'inversion de sexe de type mâle XX, soit que RSPO1/WNT4 activent d'autres voies de signalisation nécessaires au développement ovarien.

Les expériences de sauvetage génétique ont montré que *Rspo1* et *Wnt4* contrôlent l'activation de *Ctnnb1* dans les gonades XX. En effet, en l'absence de *Rspo1*, l'expression ectopique de *Ctnnb1* permet de rétablir un développement ovarien normal (Chassot et al. 2008a). Cependant, *Wnt4* et *Rspo1* semblent ne pas être les seuls à activer la transcription de *Ctnnb1* puisque dans les mutants perte de fonction de *Rspo1* et *Wnt4*, l'expression d'*Axin2* persiste dans la région coelomique des gonades XX (Chassot et al. 2012). Ainsi, il semble que d'autres régulateurs positifs de la voie de signalisation WNT/ β -catenin restent à identifier.

L'absence de *R-spondin1* et *Wnt4* induit une inversion de sexe de type mâle XX.

Tout a commencé avec la découverte de patients humains 46, XX porteurs de mutations du gène *RSPO1*. Ces patients présentent une inversion du sexe de type mâle XX, avec hypospadias et hypogénitalisme (Parma et al. 2006). En 2008, l'analyse d'une gonade d'un autre patient portant une mutation homozygote *RSPO1* indique la présence de tissus testiculaire et ovarien (Tomaselli et al. 2008). De manière similaire, dans le modèle murin perte de fonction de *Rspo1*^{-/-}, les souris XX présentent une inversion de sexe partielle caractérisée par la présence d'un ovo-testicule. Les gonades présentent des tubes séminifères contenant des cellules de Sertoli, du tissu interstitiel et un vaisseau cœlomique, et elles ont l'aspect d'un testicule hypoplasique. La partie ovarienne de ces gonades mutantes, plus ou moins développée suivant les individus, présente des kystes anormaux chez les souris âgées de 11 semaines (Chassot et al. 2008a).

Figure 4.3 : Développement d'un ovo-testicule chez le mutant XX *Rspo1*^{-/-}



Issu de (Chassot, et al. 2008b).

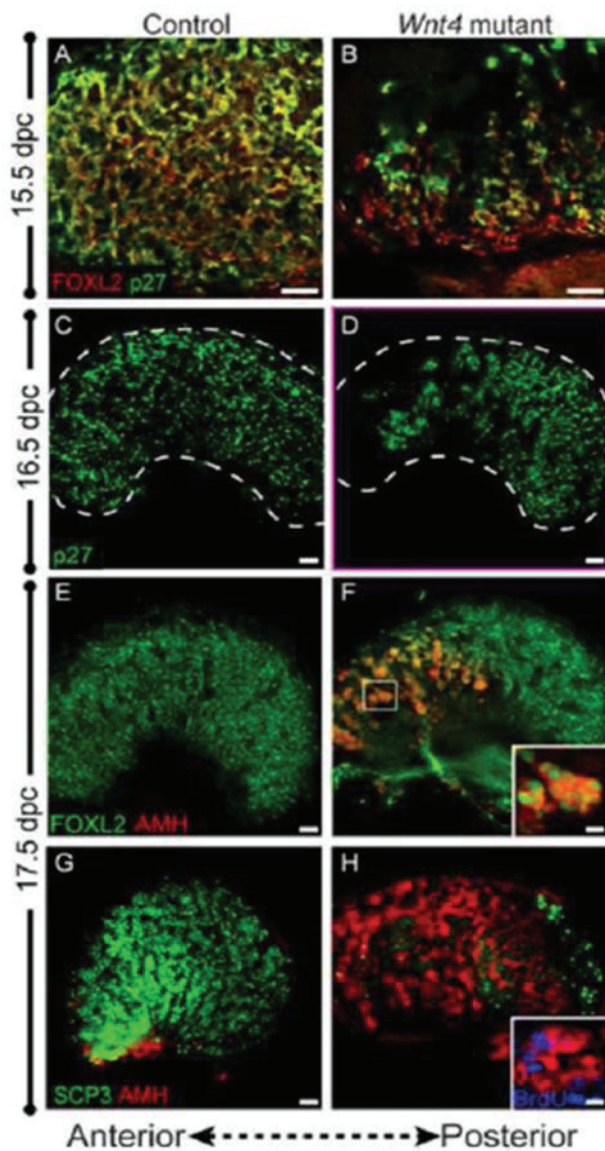
Chez l'Homme, les mutations homozygotes de *WNT4* chez les patients XX sont associées à des anomalies du développement telles que l'agénésie rénale et l'inversion de sexe de type mâle XX (Mandel et al. 2008). Des analyses histologiques ont montré que l'inversion de sexe semble complète puisque le développement testiculaire d'un patient était similaire à un testicule témoin. Cependant, des tissus ovariens et testiculaires ont été retrouvés chez un autre patient, indiquant une variabilité phénotypique. Chez la souris, dans le modèle *Wnt4^{-/-}*, on observe une inversion de sexe de type mâle XX avec l'apparition de structures en forme de cordons testiculaires au moment de la naissance (Maatouk et al. 2013).

R-spondin1 et *Wnt4* sont nécessaires au maintien du phénotype femelle

Au cours de la différenciation ovarienne, les cellules de la pré-granulosa cessent de proliférer, et elles expriment des inhibiteurs de cycle cellulaire tels que p27kip1. Au moment de la puberté et ensuite tout au long de la vie, les cellules de pré-granulosa vont sortir de cet état de quiescence et reprendre leur prolifération lorsque le follicule ovarien est recruté et mûrit (Edson, Nagaraja, et Matzuk 2009).

Aux alentours de 17.5 *jpc* (avant la naissance), les gonades invalidées pour *Rspo1* et *Wnt4* contiennent des cellules de la pré-granulosa qui expriment des marqueurs de la granulosa matures tels que *Amh*. En effet, les cellules de la pré-granulosa dans cette gonade mutante ne sont pas quiescentes et se différencient précocement et transitoirement, de manière antéro-postérieure, en cellules prolifératives de la granulosa. Les cellules germinales favorisent la transdifférenciation de ces cellules en cellules de Sertoli puisque dans les embryons traités au busulfan dans lesquels les cellules germinales ont été éliminées pharmacologiquement, le phénotype d'inversion de sexe est réversé (Maatouk et al. 2013).

Figure 4.4 : Les cellules de la pré-granulosa se différencient plus tôt dans le mutant *Wnt4*^{-/-}.



Issu de (Maatouk et al. 2013).

Dans les années 1990, il a été démontré que le destin des cellules germinales dépend de leur environnement somatique (McLaren et Buehr 1990). De manière intéressante, dans les mutants XX *Rspo1*^{-/-} et *Wnt4*^{-/-}, les cellules germinales se trouvent toujours localisées à l'intérieur ou à proximité immédiate des cordons de type testiculaires en développement. L'étude chronologique de ces phénotypes montre que les cellules germinales masculinisées sont observées à 12.5 jpc avant que les cellules somatiques de la gonade XX mutante ne se différencient en cellules de Sertoli.

Ces résultats non seulement contrastent avec les résultats des études précédentes (indiquant que les cellules somatiques déterminent le destin sexuel des cellules germinales) (Adams et McLaren 2002), mais ils suggèrent que les cellules germinales

jouent un rôle dans la différenciation sexuelle des cellules somatiques de l'ovaire. De manière intéressante, des expériences de culture en sandwich suggèrent que lorsque les cellules germinales XX s'engagent dans la méiose, elles renforcent le destin de l'ovaire en antagonisant la voie testiculaire. En effet lorsque les cellules germinales XX sont recombinaées avec les cellules somatiques XY, les structures en cordons testiculaires sont perturbées. Ainsi la présence de cellules germinales méiotiques peut bloquer la différenciation mâle (H. H.-C. Yao 2003).

Les cellules somatiques transdifférenciées se mettent alors à exprimer *Sox9*. Le gène *Sox9* va ensuite favoriser la formation des structures tubulaires rappelant les tubes séminifères (Vainio et al. 1999; Chassot et al. 2008a). Cette transdifférenciation se produit en l'absence de *Sry*, suggérant que d'autres gènes peuvent induire la voie de différenciation mâle (Lavery et al. 2012).

Ces résultats nous indiquent que *Rspo1* et *Wnt4* sont impliqués dans le maintien de l'état de progéniteurs des cellules de soutien de l'ovaire (Chassot, Gillot, et Chaboissier 2014).

Voie WNT/ β -catenin et cellules germinales : prolifération, différenciation sexuelle et méiose

Les cellules germinales primordiales colonisent la gonade entre 10.5 et 11.5 *jpc*. Une fois arrivées à destination, elles prolifèrent et initient des programmes de différenciation sexuelle divergents en fonction de leur environnement somatique et de signaux intrinsèques (voir Chapitre 2 : « Origine et mise en place de la lignée germinale »).

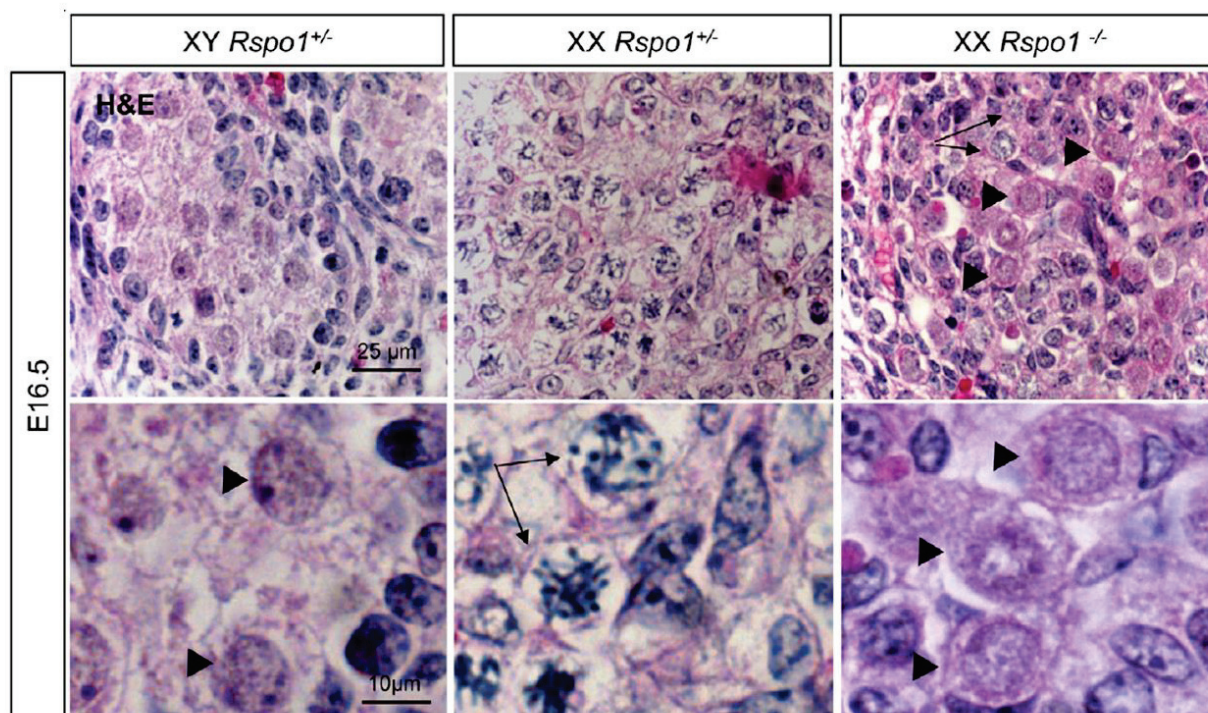
L'activation de plusieurs gènes en fonction du temps et du sexe contrôle ces différents événements. Les mutants *Rspo1* et *Wnt4* présentent tous deux des défauts de développement des cellules germinales.

R-spondin1 est impliqué dans la prolifération et Wnt4 favorise la survie des cellules germinales.

L'étude des cellules germinales chez le mutant *Rspo1*^{-/-} a montré que le nombre de cellules germinales était réduit à 12.5 *jpc* en raison d'un déficit de prolifération (Chassot et al. 2011). Cependant, seule la moitié des cellules germinales ne prolifèrent plus, indiquant un phénotype partiel chez ce modèle murin, ce qui suggère que RSPO1 n'est pas le seul facteur contrôlant le cycle cellulaire des cellules germinales femelles. A 16.5 *jpc*, une partie des cellules germinales des gonades XX mutantes ont la morphologie de gonocytes quiescents bloqués en G0 – G1. Ces cellules germinales ressemblent donc aux cellules germinales mâles au même stade, indiquant que *Rspo1* est nécessaire pour la détermination du sexe des cellules germinales (Chassot et al. 2011).

Ainsi, ces résultats démontrent que RSPO1 est impliqué dans le développement des cellules germinales en stimulant leur prolifération et en empêchant leur entrée dans un état de quiescence, soit de manière directe en activant un mécanisme intrinsèque aux cellules germinales, soit indirectement en modifiant le destin sexuel des cellules somatiques environnantes.

Figure 4.5 : Les cellules germinales déficientes pour *Rspo1* ressemblent à des pré-spermatogonies morphologiquement en phase G0-G1.



Les oogonies méiotiques sont indiquées par des flèches. Les gonocytes G0-G1 quiescents sont indiqués par des têtes de flèches. Issu de (Chassot et al. 2011).

L'étude du mutant *Wnt4*^{-/-} a mis en évidence que *Wnt4* et *Rspo1* ne jouent pas le même rôle dans le développement des cellules germinales. Chez le mutant *Wnt4*^{-/-}, le nombre de cellules germinales est similaire au nombre de cellules germinales de la gonade contrôle XX entre 11.5 et 15.5 *jpc* (H. H. C. Yao et al. 2004). Ce résultat indique que les cellules germinales prolifèrent normalement en l'absence de *Wnt4*. Au cours du développement ovarien, les cellules germinales rentrent en apoptose à 16.5 *jpc* et se limitent à la région médullaire. En situation normale, l'apoptose contribue à éliminer les ovocytes ayant subi des anomalies méiotiques (De Felici et al. 2005). Dans le mutant *Wnt4*^{-/-}, à 16.5 *jpc*, on observe une apoptose massive dans la totalité de la gonade. Cette apoptose cause une perte de 90% des cellules germinales dans le mutant contre 30% dans le contrôle (H. H. C. Yao et al. 2004).

En revanche, dans le mutant *Rspo1*^{-/-}, aucune augmentation de l'apoptose n'a été détectée à 16.5 *jpc* (Chassot et al. 2011). Ainsi, à 17.5 *jpc*, le mutant *Rspo1*^{-/-} présente un nombre de cellules germinales beaucoup plus élevé par rapport au mutant *Wnt4*^{-/-}, et ces cellules germinales sont réparties dans toute la gonade (Chassot et al. 2011; Maatouk et al. 2013).

Ces résultats démontrent que *Wnt4* est nécessaire à la survie des cellules germinales femelles, contrairement à *Rspo1*. De plus, *Wnt4* est également une cible de la voie Rspo1/WNT/ β -catenin et dans les gonades déficientes en *Rspo1*, la diminution de *Wnt4* n'est

pas complète. Les niveaux d'expression de *Wnt4* subsistant dans cette gonade mutante pourraient être suffisants pour assurer la survie des cellules germinales (Chassot, et al. 2008a; Tomizuka et al. 2008).

A 14.5 *jpc*, la moitié des cellules germinales XX déficientes en *Rspo1* maintient l'expression de *Pou5f1* et exprime *Nanos2* comme des cellules germinales XY (Chassot et al. 2011). De plus, ces cellules ont l'aspect morphologique de gonocytes bloqués en G0 – G1 à 16.5 et 18.5 *jpc*, caractéristique des cellules germinales XY ((Chassot et al. 2011) et données du double mutant *Rspo1*^{-/-} ; *Wnt4*^{-/-} non publiées). Ces résultats indiquent que la différenciation sexuelle des cellules germinales est perturbée en absence de *Rspo1* et *Wnt4*.

RSPO1 et WNT4 régulent l'entrée en méiose des cellules germinales femelles

A 13.5 *jpc*, les cellules germinales femelles perdent l'expression des marqueurs de pluripotence et initient la méiose. Chez les souris invalidées pour *Rspo1*, à 14.5 *jpc*, différentes populations de cellules germinales peuvent être observées dans la gonade XX. Environ la moitié des cellules germinales expriment des marqueurs pré-méiotiques tels que *Stra8* et *Sycp3*, l'autre moitié maintenant l'expression des marqueurs de pluripotence tels que *Pou5f1*, ou activant l'expression de marqueurs de différenciation mâle tels que *Nanos2* et *Dnmt3L* (Chassot et al. 2011).

Dans les gonades *Wnt4*^{-/-}, l'expression de *Pou5f1* est maintenue à 14.5 *jpc* et l'expression de *Stra8* est faible. Ces résultats montrent que l'absence de *Wnt4* entraîne un retard d'entrée en méiose des cellules germinales XX. Cependant, les cellules germinales finissent par rentrer en méiose puisqu'à 15.5 *jpc* où le nombre de cellules exprimant des marqueurs méiotiques est identique dans le mutant et dans le contrôle XX (H. H. C. Yao et al. 2004; Naillat et al. 2010; Maatouk et al. 2013).

Cependant, les mécanismes précis de la manière dont *Rspo1* et *Wnt4* affectent l'entrée de la méiose restent à élucider.

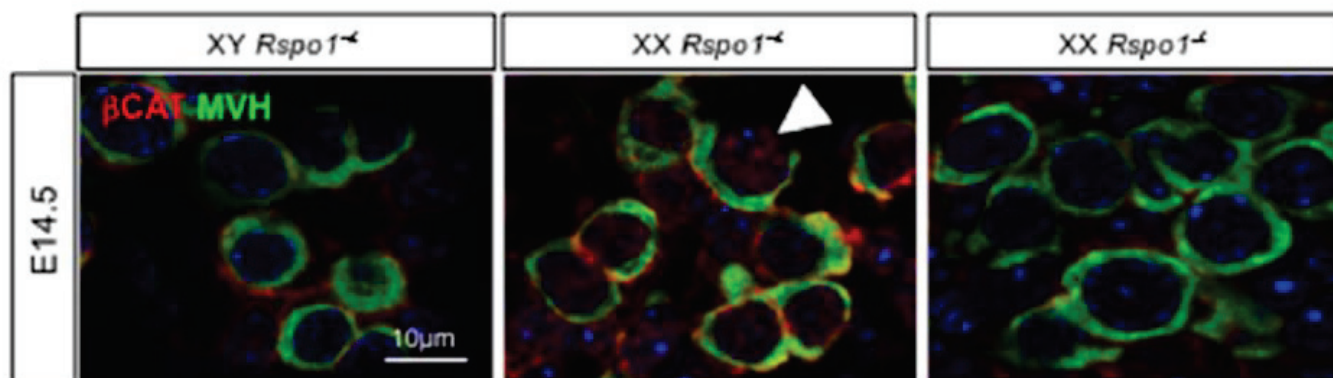
Il existe un dogme selon lequel la voie de l'acide rétinoïque (ATRA) est un régulateur clé de l'entrée de la méiose ; l'addition ectopique d'ATRA exogène sur des testicules en culture stimule l'entrée en méiose et induit l'expression de *Stra8* (Bowles et al. 2006; Koubova et al. 2006). De manière intéressante, dans les gonades *Rspo1*^{-/-} XX, l'expression de *Stra8* est fortement diminuée; cependant l'enzyme de dégradation de l'ATRA (CYP26B1) n'est pas exprimée (Chassot et al. 2011). Ainsi, les gonades *Rspo1*^{-/-}, l'absence d'expression de

Cyp26b1 suggère que l'ATRA est encore présent et que l'expression de *Stra8*, contrôlée de manière indépendante de l'ATRA, pourrait également directement ou indirectement dépendre de la voie WNT/ β -catenin.

β -catenin dans les cellules germinales femelles : activité transcriptionnelle et adhésion cellulaire

L'expression du gène *Axin2*, un marqueur universel de la voie canonique WNT/ β -caténine, est détectée dans les cellules germinales XX (Chassot et al. 2008a; Jameson et al. 2012). De plus, l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la forme active (non phosphorylée et nucléaire) de β -catenin indique que la forme active de β -catenin est présente dans les noyaux des cellules germinales et des cellules somatiques des gonades XX. De plus chez le mutant *Rspo1*^{-/-}, cette activité est inhibée dans les cellules germinales, indiquant que RSPO1 active la signalisation canonique WNT/ β -catenin dans les cellules somatiques et les cellules germinales de l'ovaire (Chassot et al. 2011).

Figure 4.6 : Détection par immunofluorescence de la β -catenin active dans les gonades XY, XX et XX *Rspo1*^{-/-}



Immunolocalisation de la β -catenin active (rouge) et MVH (cellules germinales, vertes) dans les gonades XY, XX contrôle et *Rspo1*^{-/-} à 14.5 jpc. Flèche : β -catenin active localisée au noyau des cellules germinales.

Issu de (Chassot et al. 2011)

La localisation membranaire de RSPO1 (Kocer et al. 2008; Smith et al. 2008) suggère que β -catenin est directement activée par RSPO1 dans les cellules germinales pour réguler leur destin de manière intrinsèque. Cette hypothèse est confirmée par l'étude du modèle murin perte de fonction conditionnelle de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques XX (*Sfl-Cre* ; *Ctnnb1*^{flox/flox}), dans lequel les cellules germinales entrent normalement en méiose (Manuylov et al. 2008). Ainsi, dans ce mutant, la signalisation WNT/ β -catenin dans les cellules ovariennes somatiques n'affecte pas le destin des cellules germinales.

La morphogenèse de la gonade est étroitement liée à l'expression membranaire spécifique de β -catenin et des cadhérines (CDH) dans les jonctions adhérentes (A. Fleming et al. 2012).

Chez les souris déficientes en *Rspo1*, l'activité transcriptionnelle (β -catenin nucléaire) de β -catenin est inhibée alors qu'il semble que l'expression de β -catenin membranaire est renforcée. La localisation membranaire pourrait fournir à β -catenin la capacité de fonctionner comme une molécule d'adhésion pour organiser les cellules germinales en clusters et établir les contacts cellule-cellule caractéristiques des cellules germinales mâles au même stade (Chassot et al. 2008a). Le même phénotype est également observé dans les gonades déficientes en *Wnt4* (Naillat et al. 2010). Ainsi, il est suggéré que *Wnt4* est également impliqué dans l'adhésion cellulaire. Cependant, des études *in vitro* suggèrent que RSPO1 pourrait également agir directement sur les molécules d'adhésion à la surface des cellules par l'intermédiaire de son domaine thrombospondine 1 (W. B. de Lau, Snel, et Clevers 2012). Il est possible que RSPO1 et WNT4 régulent directement l'expression et/ou la localisation des molécules d'adhésion cellulaire mais cette augmentation d'adhésion pourrait également être la conséquence indirecte d'une identité anormale des cellules germinales.

Objectifs des travaux

En 2006, mon laboratoire d'accueil a participé à l'identification de *R-spondin1*, un gène dont les mutations sont responsables d'inversion de sexe et de fortes prédispositions aux carcinomes spinocellulaires et aux tumeurs des cellules germinales. Mon laboratoire a été le premier à générer un modèle murin d'inactivation de *Rspo1* qui lui a permis d'avancer dans l'étude du mode d'action de ce gène dans la gonade. Il a montré que la protéine RSPO1 est sécrétée et contrôle l'activation *in vivo* de la voie de signalisation canonique WNT/ β -catenin, et que cette voie est nécessaire au développement de l'ovaire. Ainsi, en absence de *Rspo1*, la prolifération et la différenciation des cellules germinales primordiales sont inhibées dans l'ovaire embryonnaire. La voie WNT/ β -catenin est activée à la fois dans les cellules germinales et dans les cellules somatiques de l'ovaire embryonnaire. En absence de *Rspo1*, les cellules somatiques de la gonade XX ne se différencient pas correctement et s'engagent vers une voie de différenciation de type mâle. Avant mon arrivée au laboratoire, les mécanismes à l'origine du phénotype des cellules germinales en absence de *Rspo1* n'étaient pas clairs et rien ne permettait de déterminer si les défauts de prolifération et de différenciation de ces cellules étaient une conséquence d'un dialogue altéré entre cellules somatiques (produisant RSPO1 dans une gonade normale) et cellules germinales. Mon projet de thèse a principalement porté sur l'analyse du rôle de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules germinales de l'ovaire foetal. A mon arrivée au laboratoire et parallèlement à mon projet principal, j'ai participé à une étude démontrant que le maintien, après la naissance, de l'activité de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules germinales du testicule stimule leur prolifération de manière massive, provoquant un épuisement du pool de cellules souches spermatogoniales et aboutissant à un défaut de différenciation en spermatozoïdes (Chassot et al. 2017). Cette étude est présentée en annexe de ce manuscrit.

Ces différentes observations indiquent que dans l'ovaire comme dans le testicule, une régulation fine de l'activité de cette voie de signalisation est requise pour la différenciation normale des cellules germinales en gamètes aptes à établir la fertilité de l'individu.

Par ailleurs, les événements moléculaires à l'origine des tumeurs des cellules germinales sont peu connus et à l'heure actuelle, la plupart des marqueurs sériques de ces tumeurs sont non spécifiques, non prédictifs et ne permettent pas un diagnostic précoce. Les tumeurs des cellules germinales ont pour origine des cellules germinales primordiales ayant conservé ou réactivé leurs caractéristiques embryonnaires de pluripotence et d'auto-

renouvellement. Ainsi, les cellules germinales néoplasiques caractéristiques de ces tumeurs présentent un patron d'expression génique et protéique ainsi qu'une empreinte épigénétique semblable à ceux des cellules germinales primordiales.

Caractériser les mécanismes moléculaires contrôlant la différenciation normale des cellules germinales permettra d'identifier des marqueurs diagnostiques et des cibles thérapeutiques des cancers des cellules germinales.

Mon projet de thèse s'est donc orienté vers l'analyse du rôle de la voie WNT/ β -catenin dans la différenciation normale et pathologique des cellules germinales. J'ai caractérisé ainsi l'expression de β -catenin au cours du développement des cellules germinales femelle, ce qui constitue l'article présenté dans la partie Résultat 2.

Le modèle murin d'ablation de *Rspo1*, ubiquitaire et constitutive, ne permettant pas une étude fine du rôle de la voie WNT/ β -catenin dans chaque type cellulaire de l'ovaire en développement, nous avons ensuite décidé de générer différents outils nous permettant d'appréhender le mécanisme d'action de cette voie de manière plus spécifique, *in vivo*.

Les travaux présentés dans ce manuscrit se divisent en deux objectifs :

1) Analyser les conséquences sur le développement des cellules germinales de l'inhibition de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules somatiques de l'ovaire embryonnaire. Pour cela, j'ai mis au point un modèle de perte de fonction de β -catenin dans les cellules somatiques (souris *Wt1:CreErt2; Ctnnb1^{Flox/Flox}*) et j'ai déterminé si l'activité de β -catenin dans ces cellules influence la différenciation des cellules germinales femelles. Les résultats obtenus suggèrent que les cellules germinales ont besoin d'un signal provenant des cellules somatiques et dépendant de la voie WNT/ β -catenin pour se différencier et initier la méiose.

2) Nous avons dans un second temps analysé les conséquences de la délétion du gène *Ctnnb1* dans les cellules germinales au cours du développement. Je me suis donc investie dans la mise au point d'un modèle murin perte de fonction de β -catenin dans les cellules germinales (souris *Sox2:CreErt2; Ctnnb1^{Flox/Flox}*). J'ai pu ainsi étudier le mécanisme moléculaire par lequel β -catenin intervient pour réguler la différenciation des cellules germinales et en particulier contrôler leur sortie de l'état de pluripotence, et la transition entre PGCs et gonocytes aptes à la gamétogenèse.

De plus, j'ai pu utiliser un modèle permettant un gain de fonction de β -catenin dans la gonade (souris *Gsk3 β ^{-/-}*) par l'inactivation du gène *Gsk3 β* qui va entraîner une accumulation de la β -catenin dans les cellules de la gonade. Enfin, des collaborations avec le laboratoire du Dr. Andy Greenfield au MRC Harwell Institute, UK, et le laboratoire du Pr. Hans Clevers au Hubrecht

Institut, Pays Bas, m'ont permis d'obtenir des échantillons de souris invalidées pour le gène *Znrf3*, un régulateur négatif de la voie de signalisation WNT/ β -catenin. Les résultats obtenus indiquent une implication de *Znrf3* dans le contrôle temporel de l'activation de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules germinales femelles.

Ces différents modèles murins nous ont permis de mettre en évidence le mécanisme d'action de β -catenin dans la différenciation des cellules germinales femelles.

Enfin, soucieuses de pouvoir transposer nos résultats vers la médecine clinique, nous nous sommes intéressés à l'expression et l'activité de β -catenin dans des tumeurs des cellules germinales chez l'Homme. Une collaboration avec le service d'anatomo-pathologie du CHU (Dr. Damien Ambrosetti, Pr. Jean-François Michiels) nous a permis d'avoir accès à une cohorte de tumeurs des cellules germinales (séminomes et dysgerminomes). Nous avons ainsi étudié l'expression de RSPO1, de β -catenin et de marqueurs des cellules germinales sur des coupes histologiques de ces tumeurs. Les résultats préliminaires obtenus nous ont permis de mettre en évidence une réactivation de la voie de signalisation WNT/ β -catenin dans les tumeurs des cellules germinales.

Les résultats de l'objectif 2 sont présentés sous forme d'article scientifique actuellement en cours de soumission, tandis que l'objectif 1 (plus préliminaire) est présenté sous forme de résultats. Enfin, les résultats obtenus en collaboration avec le CHU de Nice ont été intégrés au sein de la discussion.

Les résultats des différentes études de mon doctorat et les articles présents en annexe feront l'objet d'une discussion qui sera présentée dans la partie « Discussion générale et Perspectives ».

Matériel et méthodes

Modèles Murins :

Les expériences ont été réalisées dans le respect des lois, directives européennes relatives au bien-être des animaux. Toutes les expériences ont été approuvées par le comité d'éthique français (Comité institutionnel pour l'animal de laboratoire; numéro NCE-297 et 562).

Toutes les souris ont été maintenues sur un fond mix 129/C57BL/6J. Les souris *Sox2^{tm1(cre/ERT)/Hoch}* (ou *Sox2-CreERT2*), *Ctnnb1^{tm2/Kem}* (ou *Ctnnb1^{FloxFlo/x}*), *Znrf3^{Flox}*, *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* (ou *mTmG*), *Axin2-CreERT2*, and *Wt1^{tm2(cre/ERT2)Wtp}* ont été décrits précédemment et génotypés tels que rapportées dans les études suivantes (Arnold et al. 2011; Brault et al. 2001; Koo et al. 2012; Muzumdar et al. 2007; van Amerongen, Bowman, et Nusse 2012).

Les génotypages ont été réalisés à partir d'ADN extrait de biopsie de queues (embryons) ou d'oreilles (adultes) des souris. Les différentes CreERT2 recombinases ont été activés chez les embryons par administration de tamoxifène (ref. T5648, Sigma-Aldrich). Le tamoxifène est dilué directement dans de l'huile de maïs à 40mg/mL. Le tamoxifène est administré aux femelles gestantes, deux fois (4mg/20g de souris) par gavage à 9.5 *jpc* et 10.5 *jpc*.

Les portées obtenues comportent des embryons pour lesquels *Ctnnb1* a été excisé lors de l'induction par TAM car ils portaient le transgène *CreERT2*, ainsi que leurs compagnons de portée (contrôles) n'étant pas porteurs du transgène *CreERT2*.

Pour les expériences de prolifération, la 5-bromo-2'-désoxy-uridine (BrdU) (cat. B5002, Sigma-Aldrich) a été diluée à une concentration de 10 mg/mL dans de H₂O stérile, administrée aux femelles gestantes à une concentration finale de 10µg/mL par injection intrapéritonéale et les femelles gestantes et leurs embryons ont été sacrifiés 3 heures après l'injection.

Dissections :

Les souris des différentes lignées sont mises en croisement comme indiqué ci-dessus, et le jour de la fécondation, déterminé par la présence du bouchon muqueux, est noté 0.5 *jpc*.

Les mères gestantes sont sacrifiées et leurs embryons disséqués à différents stades de gestation : 12.5, 13.5, 14.5 et 18.5 *jpc*. Les échantillons collectés sont soit fixés dans de la paraformaldéhyde (PFA) (15710-S, Sigma-Aldrich) diluée à 4% toute la nuit à 4°C, soit

congelés dans de l'azote pour réaliser les extractions d'ARN. Les échantillons fixés sont ensuite traités pour être inclus en paraffine.

Génotypage des souris par PCR :

Les souris obtenues sont génotypées par PCR avec les couples d'amorces décrits pour chaque lignée :

Tableau A: Primers de génotypes des modèles murins

Nom	Primers
Ctnnb1 ^{Flox/Flox}	Rw : CACCATGTCCTCTGTCTATTC
	Fw : AAGGTAGAGTGATGAAAGTTGTT
Cre Universelle	Rw : CACGGGCACTGTGTCCAGACCAG
	Fw : CAGGATATACGTAATCTGGC
WT1-CreERT2	Rw : CCAAGTCCAGCGCCGAGAAT
	Fw : TGTCCATCAGGTTCTTGCGA
mTmG	Rw : CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT
	Fw : CGAGGCGGATCACAAGCAATA
	Rw : TCAATGGGCGGGGGTTCGTT
Gsk3 β	Rw : CCAGTCACAAATCGTACTGC
	Fw : AACACAGTAGTGGCAACTC
	Rw : CGTGCTACTTCCATTTGTCACG

Analyses immunohistochimiques

Analyses Histologiques

Les gonades disséquées sont fixées en solution de Bouin (Sigma ref : HT10132-1L) à 4°C sur la nuit et enrobées en paraffine à la plate-forme d'histopathologie expérimentale de l'iBV, CNRS UMR7277-INSERM U1091-UNS. Des coupes réalisées au microtome de 5 μ m d'épaisseur ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E) (ref. MHS32-1L, Sigma-aldrich) conformément aux procédures standard. Les photos ont été prises avec un microscope MZ9.5 (Leica) couplé à une caméra DHC490 (Leica) et au logiciel V3.3.0 de la suite d'applications Leica, puis traitées avec Adobe Photoshop.

Hybridation *in situ* :

Des sections réalisées au microtome de 7µm d'épaisseur sont traitées pour l'hybridation *in situ*. La sonde ARN *Stra8* marquée à la digoxigénine a été synthétisée et des analyses d'hybridation *in situ* ont été effectuées comme décrit dans (Chassot et al. 2011). L'imagerie a été réalisée sur un microscope MZ9.5 (Leica) associé à une caméra DHC490 (Leica) et au logiciel V3.3.0 de la suite d'applications Leica, puis traitée avec Adobe Photoshop.

RNAscope

Pour les expériences de RNAscope, les échantillons sont fixés dans la PFA 4% (15710-S, Sigma-Aldrich) toute la nuit à température ambiante. Les sections de 5µM sont traitées pour détecter les ARN par hybridation *in situ* en utilisant le kit de détection RNAscope 2.0 High Definition-RED Kit en suivant les instructions d'utilisation (ACDBio (F. Wang et al. 2012)). La sonde *Znrf3* a été produite par la compagnie ACDBio. Les sections ont été co-marquées par l'anticorps DAZL pour détecter les cellules germinales et du DAPI dilué dans un milieu de montage 10µg/mL (Vectashield, Vector laboratories) pour détecter les noyaux. Les résultats du RNAscope ont été acquis sous un microscope confocal Leica DM5500 TCS SPE sur un support vertical (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), en utilisant un objectif ACS APO 63X oil 1.3 NA. Les lasers utilisés sont des diodes laser (405 nm, 488 nm and 532 nm). Le microscope est équipé d'un étage galvanométrique afin de faire des acquisitions z.

Immunofluorescence

Les sections de gonades 5µM sont réhydratées et les antigènes sont démasqués par l'automate PT Link, Dako. Le module PT Link utilise deux solutions commerciales, une à pH6 et une autre à pH9 (ref. K8004 et K8005, Agilent). Le choix du pH est réalisé suivant le point isoélectrique des anticorps d'intérêt. Les analyses d'immunofluorescence ont été effectuées comme décrit dans (Chassot et al. 2011). Les anticorps suivants ont été utilisés.

Tableau B : Anticorps utilisés

Nom	Dilution	Ref.
CDH1	1 : 100	610182, BD Transduction Laboratories
CDX2	1 : 200	AM392, Biogenex
Active CTNNB1 (ABC)	1 : 200	05-6665, Millipore
CTNNB1	1 : 200	C2206, Sigma-Aldrich
DAZL	1 : 200	GTX89448, Genetex
DDX4	1 : 200	13840, Abcam
FOXL2	1 : 300	5096, Abcam
GFP	1 : 750	TP401, Torrey Bioabs
GSK3 α	1 : 250	135653, Santa Cruz
LEF1	1 : 250	137872 Abcam
MKI67	1 : 150	M3062 Spring Bioscience
POU5F1	1 : 150	611202 BD Transduction Laboratories
SOX2	1 : 200	97959 Abcam
SOX9	1 : 200	HPA001758, Sigma-Aldrich
TRA98	1 : 150	82527 Abcam
FUT 4 (SSEA1)	1 : 200	21702 Santa-Cruz
Kit BrDU		11 296 736 001 Roche

L'imagerie a été réalisée avec un microscope motorisé Axio Imager Z1 (Zeiss) couplé à une caméra Axioacam Mrm (Zeiss) et les images ont été traitées avec Axiovision LE et ImageJ. Le logiciel ImageJ a été utilisé pour quantifier les cellules germinales en prolifération par rapport aux cellules germinales totales.

Analyses par RT-quantitative PCR (RT-qPCR)

Les ARN totaux sont extraits à partir des gonades congelées en azote par l'utilisation du kit RNAextraction microkit Quiagen. La transcription inverse est réalisée sur 200ng d'ARN par l'enzyme M-MLV (ref. 28025-13, Reverse Transcriptase, Invitrogen).

Tous les dosages PCR en temps réel ont été réalisés à l'aide du kit SYBR Green (ref. SFLCKB, Sigma-Aldrich), conformément aux instructions du fabricant. La QPCR a été réalisée sur l'ADNc d'une gonade et comparée à une courbe standard. Les QPCR ont été répétés au moins trois fois. Les niveaux d'expression relatifs de chaque échantillon ont été quantifiés au cours du même essai et normalisés en mesurant la quantité d'ADNc du gène *Sdha* (qui représente le nombre total de cellules gonadiques). Les couples d'amorces utilisés ont été désignés sur (<https://www.rocheappliedscience.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>).

Tableau C : Amorces Q-PCR

Nom	Primers
Axin2	Rw : GAGAGTGAGCGGCAGAGC
	Fw : CGGCTGACTCGTTCTCCT
Cdh1	Rw : CAGAATGACAACAGGCCAGA
	Fw : TTCATCACGGAGGTTCTTG
Cdx2	Rw : CTGAGGCTGGGAAGGTTGT
	Fw : TCACCATCAGGAGGAAAAG
Dazl	Rw : GCTGATATTTGCCCAATGAA
	Fw : ATGCTTCGGTCCACAGACTT
Ddx4	Rw : CCAAGATCAGGGGACACAGT
	Fw : CTTTGGTAAGTGTCCACCATTGC
Dppa3	Rw : TCTGGAAATTAGAACGTACATACTCC
	Fw : TTTATGTGAAGTTTAGAAGCCTCAAG
Gsk3 β	Rw : TTCTACAGGACAAGCGATTTAAGA
	Fw : CGGACTATGTTACAGTGGTCTAGC
Lef1	Rw : TCCTGAAATCCCACCTTCT
	Fw : TGGGATAAACAGGCTGACCT
Milli	Rw : TAGAAGGGATGCACAGGTC
	Fw : TTGATGGCTCTATTCTTTATCTTCC
Nanog	Rw : TTCTTGCTTACAAGGGTCTGC
	Fw : AGAGGAAGGGCGAGGAGA
Pou5f1	Rw : GTTGGAGAAGGTGGAACCAA
	Fw : CTCCTTCTGCAGGGCTTTC
Sdha	Rw : TGTTTCAGTTCCACCCACA
	Fw : TCTCCACGACACCCTTCTG
Sox2	Rw : GAAGTGCAATTGGGATGAAAA
	Fw : TCCAAAACTAATCACAACAATCG
Stra8	Rw : AGTGTCTGAAGGTGCATGGTT
	Fw : CATCATCACTGGGTTGGTTG
Znrf3	Rw : GCACCCTTCACATACACCAC
	Fw : CAAGGCCAAGAGAGCAGTTC

Analyses biochimiques

Extraction protéique

Les gonades sont disséquées à 12.5 et 14.5 *jpc*. Elles sont regroupées par sexe et par stade embryonnaire. Les gonades fraîchement disséquées sont lavées dans du PBS 1X stérile. Elles sont ensuite homogénéisées dans un tampon de lyse décrit dans (Chassot et al. 2008b) à l'aide d'un Dounce. Les gonades sont ensuite incubées pendant 3 à 4h à 4°C sous agitation (1400 rpm). Une centrifugation douce (900g) permet de culoter les débris cellulaires et d'obtenir le surnageant contenant les protéines. La quantité de protéines est mesurée par la technique de Bradford. Les solutions protéiques sont stockées à -80°C.

Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est réalisée avec l'anticorps anti-POU5F1 de souris (2µg), incubé toute la nuit à 4°C en rotation. L'anti-POU5F1 est précipité par des billes magnétiques A/G (ref. 88802, Thermo Scientific) incubées toute la nuit à 4°C. Ensuite, des billes magnétiques sont isolées par magnétisme et lavées trois fois dans une solution saline tamponnée au phosphate. Les protéines immunoprécipitées sont dénaturées dans un volume égal de 2x tampon de Laemmli, séparées sur un gel de page SDS de Polyacrylamide à 10%, transférées sur des membranes de transfert de PVDF Immobilon-E (ref. IEVH85R, Merck) et incubées avec les anticorps primaires. Des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase ont été utilisés pour la détection chimioluminescente (ref. PI-1000 et PI-2000, Vector). La détection du signal est réalisée avec le kit ECL Prime Western Blotting detection Reagent (ref. RPN2232, GE Healthcare).

Isolation des cellules germinales et culture cellulaire

Dissociation cellulaire et FACsorting

Les gonades entières d'embryons à 12.5 et 13.5 *jpc* sont disséquées, rincées, regroupées selon leurs génotypes et digérées avec une solution contenant de la papaine 80U (ref. P4762, Sigma-Aldrich), de la L-Cystéine (ref. C7352 Sigma-Aldrich), de la DNase (ref. 11284932001, Roche) et le milieu RPMI (ref. 12633012, Thermo Fisher) additionné de Napyr, EDTA et MEM pendant 2,5 min à 37 ° C. La suspension cellulaire est centrifugée et le culot final est remis en suspension dans du RPMI additionné de 10% de sérum de veau fœtal (FBS). Les cellules germinales sont isolées par tri FAC (Aria II, BD Biosciences) et ensemencées sur des lamelles recouvertes de poly-lysine (ref. P4832, Sigma) dans des plaques à 24 puits. Les cellules germinales ont été cultivées avec du DMEM (ref. 10567014, Thermo Fisher) et ont été traitées avec du CHIR99021 (ref. 4423/10, RnD Systems) pendant 24 heures. Les cellules germinales ont ensuite été fixées pendant 15 minutes dans de la PFA à 4% à la température ambiante et colorées avec un anticorps anti-POU5F1, comme décrit dans la section Immunofluorescence et analyse histologique.

Résultats

Résultat 1 : L'ablation somatique de β -catenin modifie le destin des cellules germinales XX.

Ablation de la voie Wnt/ β -catenin spécifiquement dans les cellules somatiques de la gonade

Validation du modèle murin de *Wt1-CreERT2* ; *Ctnnb1*^{Flox/Flox} dans la gonade embryonnaire.

L'inactivation de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques de la gonade a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Ainsi, plusieurs équipes ont utilisé la lignée recombinase *SF1-Cre* afin d'induire l'inactivation spécifique de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques exprimant SF1 (C.-F. Liu et al. 2008; Manuylov et al. 2008; Chassot et al. 2011). La lignée *SF1-Cre* permet une expression spécifique des progéniteurs somatiques mais la CRE recombinase n'est active qu'à partir de 11.5 *jpc*. La détermination du sexe se déroule cependant entre 10.5 et 11.5 *jpc* (Bullejos et Koopman 2005; Dokshin et al. 2013; Mayère et al. 2019). Ainsi si nous voulons étudier le rôle de la protéine β -catenin plus précocement, ce modèle est inadapté. Pour franchir cet obstacle, nous avons choisi d'utiliser une lignée dont l'expression de la CRE est sous le contrôle d'un promoteur induit plus précocement au cours du développement gonadique.

Le gène *Wt1* est exprimé précocement dans la gonade aux alentours de 9.5 *jpc* dans les cellules progénitrices de la crête génitale (Armstrong et al. 1993). Il est nécessaire au maintien des progéniteurs gonadiques car le modèle murin d'inactivation homozygote présente un phénotype de dysgénésie de la gonade rapide aux alentours de 11.5 *jpc*. *Wt1* est exprimé dans tous les progéniteurs de la crête génitale, et c'est pour cette raison que nous avons choisi d'utiliser la lignée *Wt1-CreERT2* qui permet d'exprimer la CRE recombinase de manière inductible et de cibler toutes les cellules somatiques de la gonade.

Dans un premier temps, j'ai analysé l'expression de WT1 par immunomarquage de la protéine à différents temps, 10.5, 11.5, 12.5 *jpc*, chez des embryons de souris XX (Figure 1A). La protéine WT1 est exprimée dans les cellules somatiques de l'ovaire embryonnaire entre 10.5

jpc et 12.5 *jpc*, ce qui nous permet de pouvoir mettre en place un protocole d'induction de la Cre à partir de 9.5 *jpc* puisque la Cre met environ 24h pour être active au niveau du noyau et réaliser la recombinaison génique des sites loxP.

Ensuite, j'ai croisé les souris *WT1-CreERT2* avec les souris *Ctnnb1^{Flox/Flox}* afin d'obtenir des embryons *WT1-CreERT2 ; Ctnnb1^{Flox/Flox}*. Ces embryons sont disséqués à 13.5 *jpc* après induction de la Cre par du tamoxifène à 9.5 *jpc* et 10.5 *jpc* (Figure 1B).

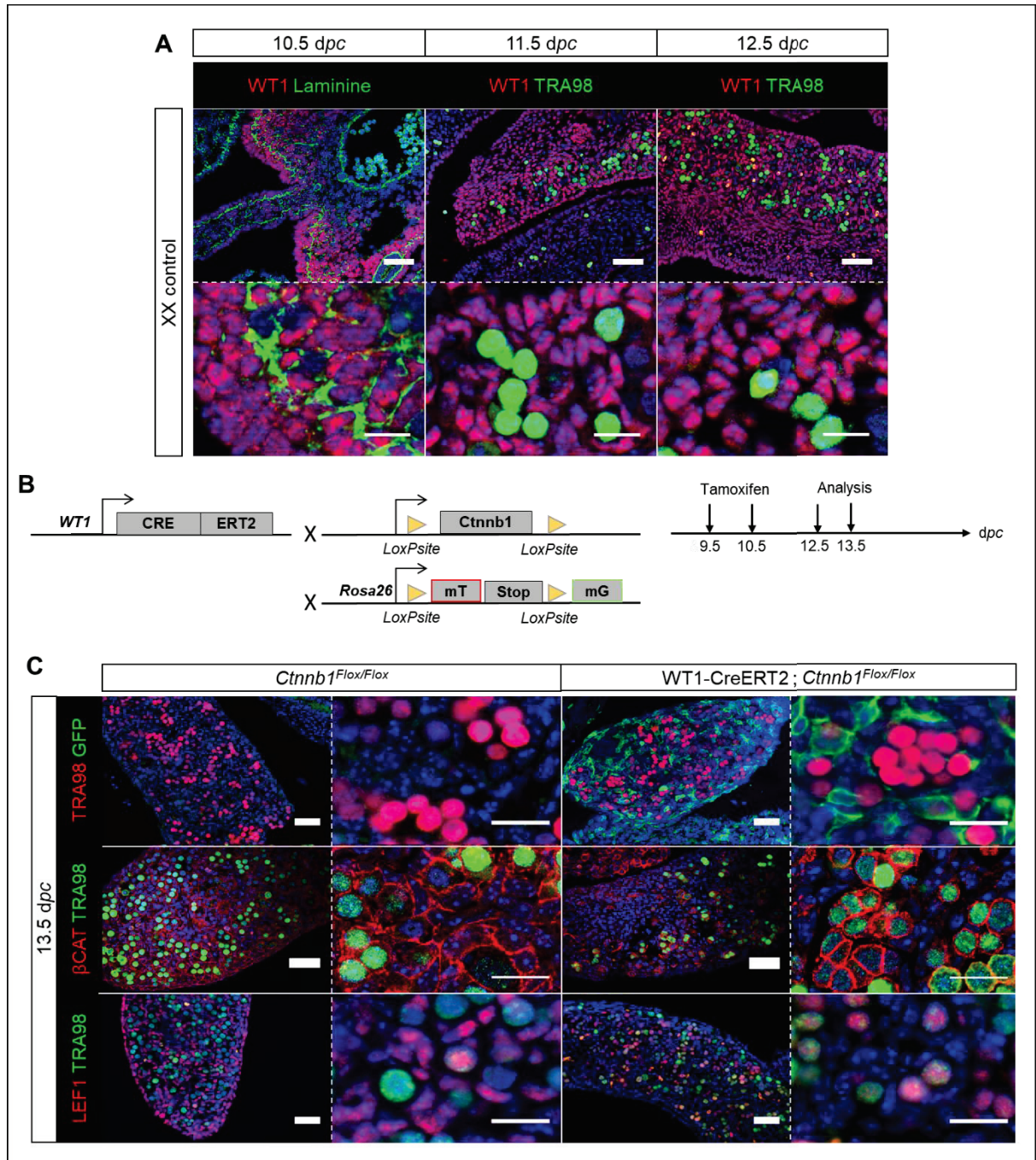
Dans un premier temps, nous avons validé ce modèle par immunomarquage pour vérifier i) l'activation de la Cre, ii) l'inhibition de l'expression de la protéine β -catenin et enfin iii) la dérégulation des gènes cibles de la voie WNT/ β -catenin, à 13.5 *jpc*.

L'activation de la Cre a été vérifiée à l'aide du rapporteur *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(CTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* (ou "mTmG") (Muzumdar et al. 2007). Les cellules où la CRE a été activée expriment la protéine GFP à la membrane à partir du moment où la CRE a été traduite, et la transmettent aux cellules filles par division cellulaire. Nous avons ainsi étudié l'expression de la GFP par immunofluorescence avec un anticorps anti GFP dans les gonades contrôles (de génotype *Ctnnb1^{Flox/Flox}*) et transgéniques (de génotype *WT1-CreERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4(CTB-tdTomato,-EGFP)Luo}*) (figure 1C). Ainsi, le modèle murin *WT1-CreERT2;Gt(ROSA)26Sor^{tm4(CTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* présente une expression de la GFP uniquement au niveau des membranes des cellules somatiques des animaux transgéniques, ce qui indique que l'induction au Tamoxifen à 9.5 et 10.5 *jpc* stimule la translocation de la CRE dans le noyau des cellules somatiques pour y recombiner les gènes possédant des site loxP.

La protéine β -catenin est exprimée chez les embryons XX dans les cellules somatiques et cellules germinales (Chassot et al. 2008a; 2011). Un anticorps dirigé contre la protéine β -catenin nous a permis de montrer que dans la gonade mutante, la protéine β -catenin est absente dans les cellules somatiques mais reste exprimée dans les cellules germinales, comme attendu (Figure 1C), indiquant que ce modèle permet une ablation efficace et ciblée du gène *Ctnnb1* dans les cellules somatiques.

L'expression de LEF1 est présente à la fois dans les cellules somatiques et les cellules germinales chez les embryons XX. *Leff1* étant un gène cible de la voie WNT/ β -catenin (Hovanes et al. 2001), j'ai analysé l'expression de la protéine LEF1 dans la gonade par immunomarquage et j'ai observé que son expression était absente dans les cellules somatiques de la gonade *WT1-CreERT2 ; Ctnnb1^{Flox/Flox}* (Figure 1C), indiquant que la voie de signalisation est éteinte exclusivement dans les cellules somatiques.

Figure 1 : La *WT1-CreERT2* est efficace pour réaliser l'ablation du gène *Ctnnb1* dans la gonade XX.

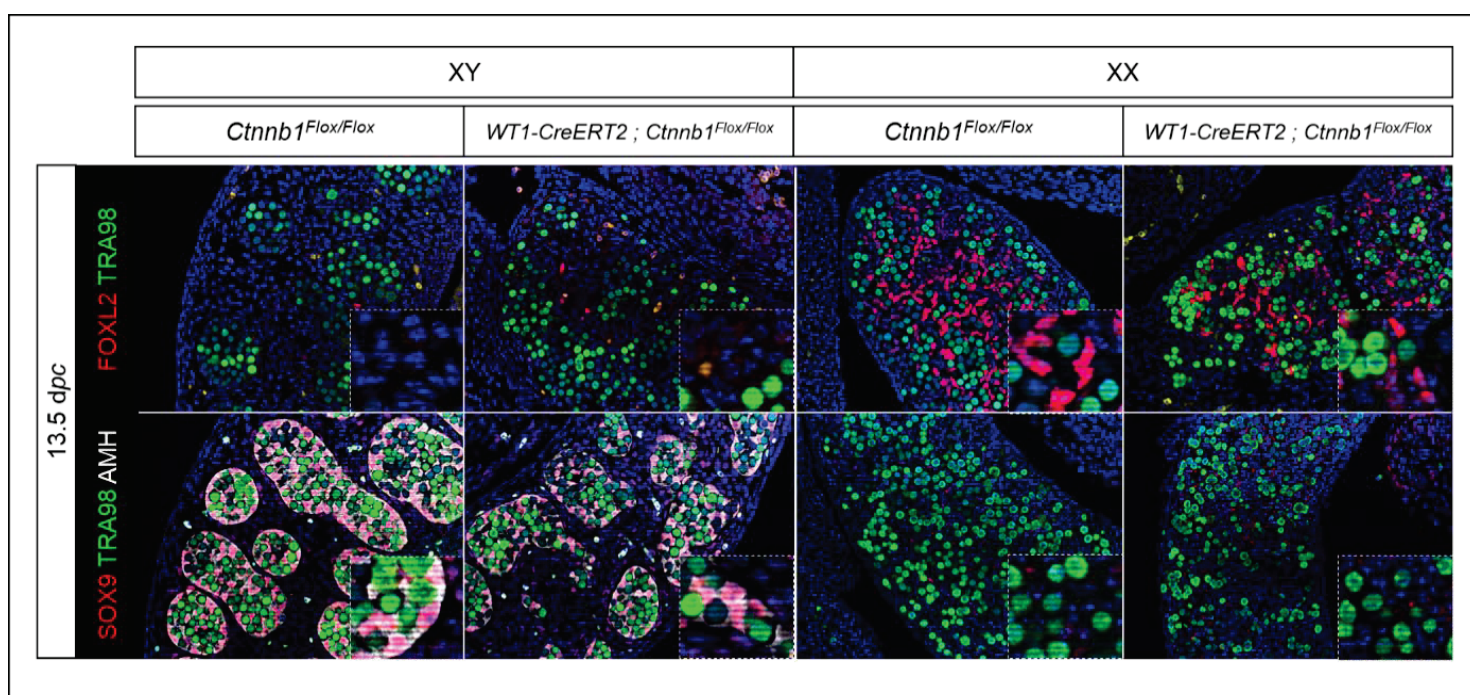


A. Immunomarquage de WT1 (rouge) et Laminine (vert) à 10.5 *jpc* (dans la figure *dpc* : day *post coitum*). La laminine délimite l'épithélium cœlomique. A 11.5 et 12.5 *jpc*, immunomarquage de WT1 (rouge) et TRA98 (vert). TRA98 est un marqueur des cellules germinales. Entre 10.5 et 12.5 *jpc*, WT1 est exprimé dans toutes les cellules somatiques des gonades XX. B. Modèle murin et protocole d'induction de la Cre recombinase par le Tamoxifen, *WT1-CreERT2* ; *Ctnnb1^{Flox/Flox}* ; *mTmG*. C. Validation du modèle murin à 13.5 *jpc* par immunomarquage. En haut : vérification de l'activation de la Cre par un immunomarquage de la GFP (vert) et TRA98 (rouge, cellules germinales). Au milieu : immunomarquage de la protéine β -catenin (rouge) qui est exprimée dans toutes les cellules de la gonade XX dans le contrôle *Ctnnb1^{Flox/Flox}*. Dans le mutant, la protéine β -catenin est exprimée uniquement dans les cellules germinales marquées par TRA98 (vert). En bas : immunomarquage de LEF1 (rouge) et TRA98 (vert, cellules germinales). Dans le contrôle LEF1 est exprimé dans toutes les cellules somatiques alors que dans le mutant, l'ablation de *Ctnnb1* entraîne la dérégulation de LEF1 uniquement dans les cellules somatiques.

Conséquence de l'ablation de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques de la gonade XX

Dans un premier temps, je me suis intéressée aux conséquences de l'ablation de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques de l'ovaire en développement. Pour cela, j'ai réalisé des immunomarquages des différents marqueurs somatiques de la différenciation sexuelle, à l'aide d'anticorps dirigés contre SOX9 et AMH (marqueurs mâles), et FOXL2 (femelle) (Figure 2).

Figure 2 : Les embryons XX à 13.5 *jpc* invalidés pour *Ctnnb1* dans les cellules somatiques ne présentent pas d'inversion de sexe.



Immunomarquage des embryons XY et XX contrôle et mutant à 13.5 *jpc*, à l'aide d'un anticorps dirigé contre FOXL2 (rouge) (en haut) et TRA98 (marqueur des cellules germinales, vert), contre SOX9 (rouge), AMH (blanc) et TRA98 (vert) (en bas).

A 13.5 *jpc*, les cellules somatiques de la gonade XY expriment les marqueurs SOX9 et AMH, tandis que celles de la gonade XX expriment la protéine FOXL2.

Le mutant XY perte de fonction de *Ctnnb1* (*WT1-CreERT2 ; Ctnnb1^{Flox/Flox}*) ne présente pas d'expression de FOXL2. Dans la gonade XX *WT1-CreERT2 ; Ctnnb1^{Flox/Flox}*, FOXL2 est toujours exprimé dans les cellules somatiques, mais il semble qu'il y ait une diminution de son expression qu'il reste à quantifier (en cours). De même, l'étude par Q-PCR de l'expression de différents marqueurs tels que *Fst*, *Wnt4*, *Rspo1* permettra également de vérifier si leur expression dépend ou non de celle de *Ctnnb1*. En effet, *Rspo1* n'est pas affecté par l'absence de *Ctnnb1* alors que *Wnt4* et *Fst* sont régulés négativement (Chassot et al. 2008b; C.-F. Liu et al. 2008), indiquant qu'ils agissent respectivement en amont (*Rspo1*) et en aval de la voie de

signalisation WNT/ β -catenin (*Wnt4*, *Fst*). Il serait intéressant de confirmer ces résultats avec notre modèle murin.

Ces données indiquent que le modèle *WT1-CreERT2*; *Ctnnb1*^{Flox/Flox} ne présente pas d'inversion de sexe de type femelle XY détectable à ce stade de développement. Cependant, les embryons XX *WT1-CreERT2*; *Ctnnb1*^{Flox/Flox} sont caractérisés par l'apparition d'un vaisseau cœlomique à 13.5 *jpc* (données non montrées), un vaisseau sanguin que l'on ne trouve normalement que dans le testicule. Ces résultats sont identiques aux études dans lesquelles l'expression des gènes *Rspo1*, *Wnt4*, *Fst* ou *SF1-Cre*; *Ctnnb1*^{Flox/Flox} est abolie (Jeays-Ward 2003; H. H. C. Yao et al. 2004; Chassot et al. 2008a; Tomizuka et al. 2008). Ainsi, l'ensemble de ces résultats implique que la voie β -caténine inhibe la formation de la vascularisation testiculaire dans les ovaires fœtaux.

L'étude du phénotype des mutants XX *WT1-CreERT2*; *Ctnnb1*^{Flox/Flox} à des stades de développement plus tardifs (aux alentours de la naissance) devrait nous indiquer si l'ablation du gène *Ctnnb1* dans les cellules WT1-positives induit une inversion de sexe tardive comme c'est le cas dans le mutant *Rspo1*^{-/-}. Malheureusement, l'induction précoce à 9.5 *jpc* du Tamoxifen induit des avortements spontanés à partir de 13.5 *jpc*, et il est très difficile d'obtenir des embryons après 14.5 *jpc*, empêchant ce jour de poursuivre l'analyse phénotypique à des stades tardifs.

Les cellules germinales ne se différencient pas en l'absence de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques des embryons XX.

A 13.5 *jpc*, en conditions normales, les cellules germinales XX ont engagé leur différenciation sexuelle et initient la méiose. La plupart des gonocytes n'expriment plus les marqueurs de pluripotence tels que POU5F1 (OCT3/4) et SSEA1 et leur prolifération est également très réduite. Les gonocytes expriment alors des marqueurs tels que DDX4 et DAZL. A l'heure actuelle, nous ne disposons pas de marqueurs spécifiques de l'engagement du destin femelle des gonocytes. Le travail réalisé dans l'équipe de Serge Nef à Genève (Mayère et al. 2019), basé sur le séquençage en cellule unique de cellules germinales, va bientôt ouvrir de nouvelles perspectives dans ce domaine.

Dans les gonades de génotype XX *SF1-Cre*; *Ctnnb1*^{Flox/Flox}, la délétion de *Ctnnb1* à 13.5 *jpc* ne modifie pas la prolifération des cellules germinales (Chassot et al. 2011). De plus, l'analyse histologique démontre que les ovogonies ont initié la méiose avant de devenir apoptotiques. De plus, à partir de 16.5 *jpc*, le nombre de gonocytes diminue jusqu'à une

disparition complète à la naissance (C.-F. Liu et al. 2008), et l'étude du marqueur γ H2AX (forme phosphorylée de l'histone H2AX, qui se détecte lorsque des ruptures ADN double brin apparaissent), un effecteur de la méiose, montre qu'il n'y pas de dérégulation de la méiose des gonocytes dans ces conditions. Ainsi, ces deux études indiquent que β -catenin, dans les cellules SF1-positives, n'est pas requise pour l'initiation de la méiose mais qu'elle est essentielle pour la survie des gonocytes méiotiques qui nécessite un environnement somatique correctement différencié dans l'ovaire fœtal.

Dans le mutant XX *WT1-CreERT2 ; Ctnnb1^{Flox/Flox}*, nous avons pu observer que l'expression des marqueurs de pluripotence tels que POU5F1 et SSEA1 est maintenue, contrairement ce qui est observé dans l'ovaire contrôle où ces marqueurs sont régulés négativement pour permettre aux gonocytes d'acquies la possibilité d'entrer en méiose. Ce processus, que certains auteurs appellent le *Licensing*, est essentiel pour permettre la différenciation des cellules germinales primordiales en cellules compétentes pour la gamétogenèse. Ainsi, en absence d'activité WNT/ β -catenin dans les cellules *Wt1*-positives, les cellules germinales conservent leur état de pluripotence et ne se différencient pas en gonocytes. *Wt1* étant exprimé plus précocement que *Sfl* dans les progéniteurs somatiques, ces données indiquent que la voie WNT/ β -catenin est nécessaire avant l'expression de *Sfl* dans ces progéniteurs pour permettre une différenciation correcte des cellules somatiques, et ainsi pouvoir synchroniser le développement somatique avec la différenciation des cellules germinales. Ces résultats sont en accord avec les données non publiées produites au laboratoire par une autre étudiante en thèse, Furong Tang, tirées de l'analyse des mutants conditionnels *Rspo1^{-/-}* (Tang et al, en préparation).

Pour étudier la prolifération des cellules germinales, j'ai réalisé des injections de BrdU (BromodeoxyUridine, un analogue de base azotée s'incorporant dans l'ADN lorsque les cellules entrent en phase S du cycle cellulaire) aux mères gestantes 3h avant la dissection des embryons. Nos résultats indiquent une augmentation de la prolifération des cellules germinales chez les mutants XX *WT1-CreERT2 ; Ctnnb1^{Flox/Flox}* (il s'agit d'une tendance car nous n'avons pas à ce jour collecté suffisamment d'échantillons pour faire une analyse statistique robuste). La prolifération des cellules somatiques ne semble pas affectée en l'absence de *Ctnnb1* (Figure 3C). Ces résultats suggèrent que les cellules germinales qui maintiennent l'état de pluripotence continuent à proliférer alors que dans l'ovaire contrôle, les gonocytes différenciés, ayant perdu leur pluripotence, ont arrêté de proliférer.

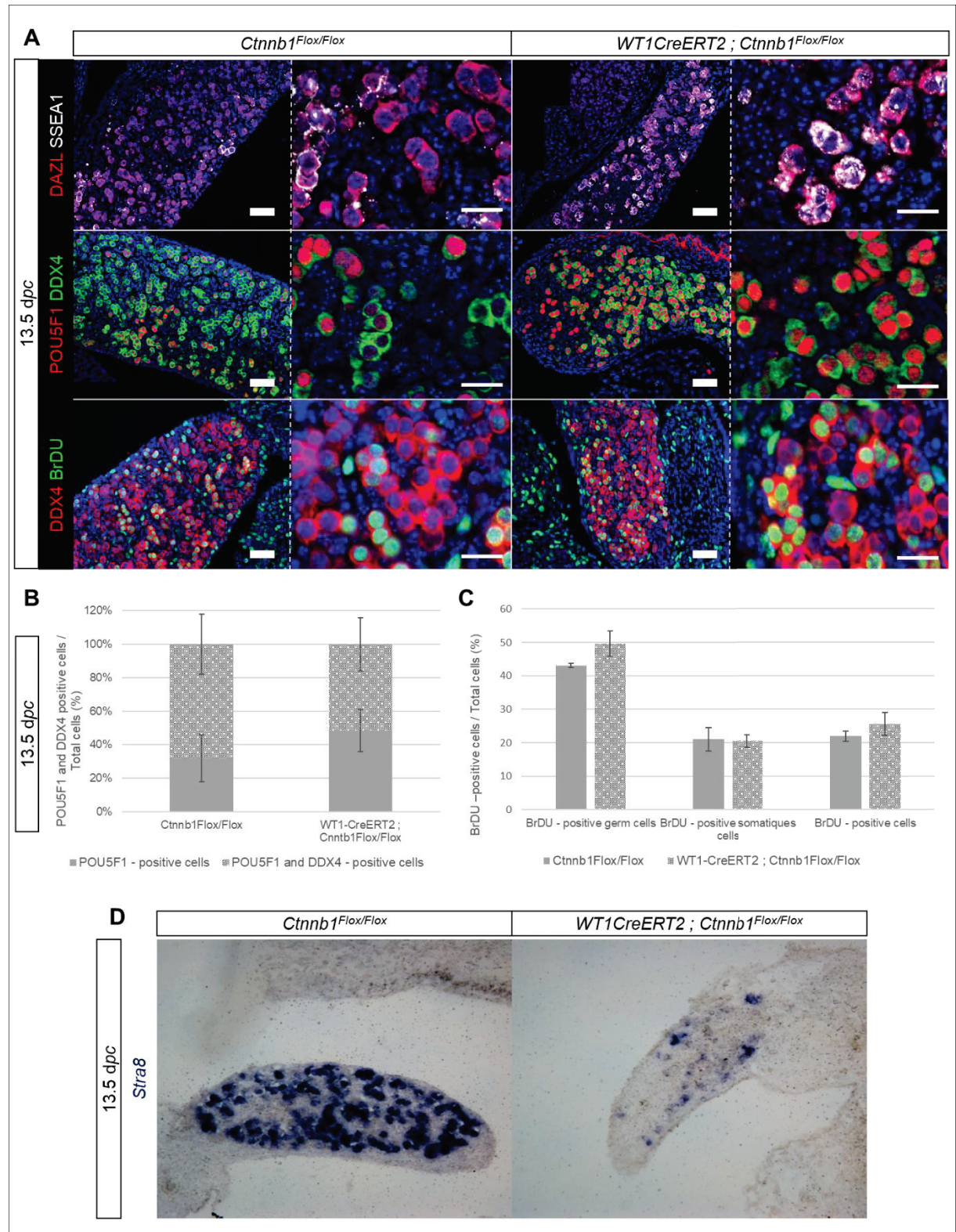
Au cours de leur développement, les cellules germinales XX fœtales passent d'un cycle cellulaire mitotique (prolifération) à un cycle cellulaire unique et particulier : la méiose. A 13.5 *jpc*, elles expriment alors *Stra8*, un gène impliqué dans la duplication de l'ADN

qui précède l'entrée en méiose, alors que les cellules germinales mâles s'arrêtent en phase G0/G1 du cycle cellulaire et resteront quiescentes jusqu'à la reprise de la prolifération et l'entrée en méiose à la puberté.

Dans les mutants XX *WT1-CreERT2*; *Ctnnb1^{Flox/Flox}* l'expression de *Stra8*, détectée par hybridation *in situ*, est très fortement diminuée par comparaison à la gonade contrôle (Figure 3D), indiquant que les cellules germinales ne sont pas rentrées en méiose à ce stade de développement.

L'ensemble de ces résultats indique que les gonades XX *WT1-CreERT2*; *Ctnnb1^{Flox/Flox}* présentent un phénotype similaire à celui qui est observé dans les gonades XX *Rspo1^{-/-}* (Chassot et al. 2011). Dans le mutant invalidé pour *Rspo1*, les cellules germinales restent indifférenciées (expression de POU5F1 maintenue) et n'entrent pas en méiose (inhibition de *Stra8*). Les cellules germinales XX adoptent ensuite un destin de type mâle et se mettent à exprimer des marqueurs spécifiques des gonocytes XY quiescents tels que *Nanos2* et *Dnmt3L*. Cependant, dans le mutant *Rspo1^{-/-}*, la prolifération des cellules germinales est fortement diminuée. Il est important de noter que, à la différence des animaux XX *WT1-CreERT2*; *Ctnnb1^{Flox/Flox}*, le mutant *Rspo1^{-/-}* résulte d'une ablation ubiquitaire et non conditionnelle du gène *Rspo1*, affectant tous les types cellulaires.

Figure 3 : Les cellules germinales ont besoin d'un signal provenant de l'environnement somatique pour initier la méiose.



A. Premier panel, immunomarquage de DAZL (rouge) et SSEA-1 (blanc). Deuxième panel, immunomarquage de DDX4 (vert) et POU5F1 (rouge). Troisième panel, immunomarquage de DDX4 (rouge) et BrdU (vert). B. Quantification du pourcentage de gonocytes pluripotents par rapport au nombre total de cellules germinales au moyen des marqueurs POU5F1 et DDX4. n=2 embryons, 4 gonades. C. Quantification de la prolifération des gonocytes et des cellules somatiques. n=2 embryons 4 gonades. D. Hybridation *in situ* de l'ARNm de *Stra8* (bleu).

Pour conclure, nos résultats, bien que préliminaires, suggèrent que les cellules germinales ont besoin d'un signal provenant des cellules somatiques et dépendant de l'activité de la voie WNT/ β -catenin dans ces cellules pour se différencier sexuellement et initier la méiose, et que cette voie de signalisation doit être activée dès 10.5 *jpc* dans les progéniteurs somatiques de façon à stimuler une cascade d'évènements moléculaires permettant de synchroniser développement somatique et germinale.

Résultat 2 : A β -catenin/OCT3/4
regulatory loop triggers exit from
pluripotency in primordial germ cells.

**A B-CATENIN/OCT3/4 REGULATORY LOOP TRIGGERS EXIT FROM
PLURIPOTENCY IN PRIMORDIAL GERM CELLS.**

Morgane Le Rolle¹, Filippo Massa^{1,2}, Pamela Siggers³, Agnès Loubat¹, Andreas Schedl¹, Hans Clevers⁴, Andy Greenfield³, Marie-Christine Chaboissier^{1,*} and Anne-Amandine Chassot^{1,*,&}.

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, France

² Inovarion Paris, France

³ Mammalian Genetics Unit, Medical Research Council Harwell Institute, Oxfordshire, United Kingdom

⁴ Hubrecht Institute, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Utrecht, The Netherlands

* Co-last authors

& Corresponding author: Anne-Amandine Chassot
Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM,
iBV, Institut de Biologie Valrose,
Centre de Biochimie;
UFR Sciences;
Parc Valrose, 28 avenue Valrose,
06108, Nice cedex 2, France.
Tel.: ++33492076451
FAX: ++33492076402
E-mail: chassot@unice.fr

1 **SUMMARY**

2

3

4 Germ cells are unipotent cells that differentiate into male or female gametes, which
5 generate, when fused together, a zygote that gives rise to all cell types of the
6 embryonic and extraembryonic tissues. Following specification and migration into the
7 gonads, female germ cells exit pluripotency, differentiate and initiate meiosis during
8 embryogenesis. In the male germ cells, WNT/ β -catenin activity has to be tuned over
9 time to ensure spermatogenesis. In the female germ cells, WNT/ β -catenin signalling
10 is activated but its role has not been investigated. Here we show, using a mouse model
11 of *Ctnnb1* loss-of-function in female germ cells, that WNT/ β -catenin signalling
12 regulates exit from pluripotency by interacting with POU5F1 (OCT3/4), leading to germ
13 cell differentiation. Our results also reveal a negative regulation loop of WNT/ β -catenin
14 activity by ZNRF3, thus identifying the molecular principles of the transition from
15 primordial germ cells to gonocytes, that will help to recapitulate gametogenesis *in vitro*.

16 INTRODUCTION

17

18 Primordial germ cells (PGCs) give rise to the next generation by differentiating from pluripotent
19 progenitors into highly specialized cells, the gametes, which in turn generate a totipotent zygote
20 after fertilization. PGCs segregate at approximately 6.5 days post-coitum (*dpc*) in mice from a
21 group of stem/progenitor cells within the allantois (Mikedis and Downs, 2014). While
22 proliferating, PGCs migrate to and colonize the embryonic gonad at mid-gestation (i.e., at 10.5
23 *dpc*), where they maintain a genomic program associated with pluripotency and express core
24 pluripotency genes such as *Pou5f1* (also known as *Oct3/4*), *Nanog*, and *Sox2* (Hayashi et al.,
25 2007; Saitou and Yamaji, 2012). As the same time, the genital ridges begin to differentiate as
26 testes under the control of *Sry* gene carried by the Y chromosome in XY (male) embryos
27 (Sinclair et al., 1990), or as ovaries under the control of *Rspo1* gene in XX (female) embryos
28 (Chassot et al., 2008b). Soon after, PGCs undergo a wave of extensive epigenetic
29 reprogramming including genome-wide loss of 5-methylcytosine (Fabre et al., 2012). While
30 gonadal somatic development is progressing, germ cells become gametogenesis-competent
31 cells, also called gonocytes (Lesch and Page, 2012). At this step, they lose pluripotency and
32 gain their capacity for irreversible sexual differentiation (Adams and McLaren, 2002).
33 Gonocytes then become either female (oogonia) or male (spermatogonia), and eventually
34 progress into meiotic divisions (Saitou and Yamaji, 2012), at 13.5 *dpc* in the ovary or after birth
35 in the testis (McLaren, 2003).

36 The mechanisms of germ cell changes in potency remain largely elusive. Others and we have
37 shown that WNT/ β -catenin signalling regulates spermatogonial stem cell proliferation and
38 differentiation in the post-natal testis, demonstrating that WNT/ β -catenin signalling activity
39 must be finely tuned over time to ensure spermatogenesis (Chassot et al., 2017; Takase and
40 Nusse, 2016). In the female embryo, R-spondin 1 (RSPO1), a secreted factor expressed by
41 somatic cells, activates the canonical WNT/ β -catenin signalling, eventually enhancing germ
42 cell proliferation and sexual differentiation (Chassot et al., 2011; Chassot et al., 2008b).
43 Nevertheless, the absence of *Rspo1* impairs the differentiation of the somatic cell types and

44 might imbalance the molecular crosstalk between germ cells and somatic cell types, thus
45 indirectly regulating germ cell fate. RSPO1 expression must then be silenced and a sustained
46 ectopic activation of RSPO1 expression in the adult ovary triggers granulosa cell defects and
47 ovarian tumors (De Cian et al., 2016). All together, these results suggest that WNT/ β -catenin
48 needs to be transiently activated and then repressed to allow proper progression into the early
49 phases of gametogenesis in both male and female gonads, from pluripotent PGCs to sexually
50 differentiated germ cells. However, a genetic model of germ cell-specific ablation of *Ctnnb1*
51 (encoding β -catenin) was still missing to assess the contribution of WNT/ β -catenin signalling
52 in female germ cells. Here we show that genetic elimination of *Ctnnb1* in mouse PGCs *in vivo*
53 leads to a precocious loss of pluripotency and to premature PGC differentiation into gonocytes.
54 We demonstrated, for the first time *in vivo*, that while ovarian development is getting forward,
55 β -catenin forms proteic complexes containing POU5F1 and CDH1 that transit from the nucleus
56 of the germ cells to their membrane, thus allowing PGCs to exit pluripotency and eventually
57 differentiate. Our results also reveal that the ZNRF3 E3-ubiquitine ligase negatively regulates
58 germ cell exit from pluripotency through a negative feedback loop.

59

60

61 **RESULTS**

62

63 **WNT/ β -catenin signalling is activated in post-migratory PGCs.**

64 Others and we have shown that WNT/ β -catenin signalling is activated in the developing ovary
65 (Chassot et al., 2008b; Liu et al., 2009; Vainio et al., 1999) and that this pathway must be shut
66 down later to ensure proper ovarian function (De Cian et al., 2016). The role of WNT/ β -catenin
67 was first addressed in the supporting cells of the developing gonad but there is evidence that
68 this pathway also regulates germ cell fate (Chassot et al., 2012; Chassot et al., 2017). So far
69 the precise window of β -catenin activation has not been carefully examined during female germ
70 cell differentiation. To investigate the timing of β -catenin activation, we first performed a time-
71 course analysis to examine the expression of known markers of the canonical WNT signalling

72 by both immunostaining and quantitative RT-PCR, in XX whole gonads at 11.5 days *post*
73 *coitum* (*dpc*) when primordial germ cells (PGCs) colonize the gonad in mice, 12.5 *dpc* when
74 somatic cells are sexually differentiated, 13.5 *dpc* when germ cells initiate meiosis, and 14.5
75 *dpc* when they are progressing in meiosis. B-catenin was strongly expressed in the nucleus,
76 cytoplasm and membrane of both somatic cells and germ cells at 11.5 and 12.5 *dpc*, and it
77 was colocalized in germ cells with POU5F1 (OCT3/4) (Fig.1A). Its expression then slightly
78 decreased at 13.5 *dpc* (as quantified in SupFig.1A), becoming restricted, in the germ cells, to
79 the cell membrane at 14.5 *dpc*. LEF1, which has been described as a WNT target in human
80 colon carcinoma (Hovanes et al., 2001) and which mRNA is synthesized in both XX somatic
81 and germ cells (Chassot et al., 2011), was strongly expressed in the nucleus of germ cells at
82 11.5, 12.5 and 13.5 *dpc*, and was then lost at 14.5 *dpc* (Fig.1A, SupFig.1A), indicating that
83 WNT/ β -catenin activity was progressively extinguished while germ cells differentiated. B-
84 catenin is essential both in cadherin-mediated cell adhesion and in canonical WNT signalling
85 (Heuberger and Birchmeier, 2010). *Cdh1* (encoding E-Cadherin), which is expressed in germ
86 cells (Di Carlo and De Felici, 2000), was also downregulated from 11.5 to 14.5 *dpc* (Fig.1A,
87 SupFig.1C), suggesting that both transcriptional activity and cell adhesion activity of β -catenin
88 were gradually lost when germ cells progressed into differentiation, as quantified in SupFig.1B
89 using FUT4 (SSEA1) as a marker of undifferentiated germ cells and DAZL as a marker of
90 differentiation (Gill et al., 2011). Moreover, mRNA levels of *Cdh1* were significantly down-
91 regulated while germ cells were progressing towards differentiation, as evidenced by the
92 increase in the expression of genes specific for differentiated germ cells such as *Ddx4*, *Dazl*
93 and *Piwil2* (*Mili*) (Jameson et al., 2012) (SupFig.1D). Nevertheless, mRNA levels of *Axin2*, a
94 direct target and a universal reporter gene of WNT canonical pathway (Lustig et al., 2002) were
95 increased as gonads developed, but this also reflected *Axin2* expression in the somatic cells.
96 In addition, the stimulation of the expression of *Axin2*, a member of β -catenin destruction
97 complex, could also participate to a negative regulation of WNT/ β -catenin canonical pathway.
98 While *Lef1* mRNA levels were not significantly changed in the whole developing gonad, they
99 were decreased in FACS-purified germ cells (SupFig.1D,E). *Cdh1* and *Lef1* expression pattern

100 followed that of pluripotency genes expressed in PGCs such as *Sox2*, *Pou5f1*, *Nanog* and
101 *Dppa3* (Jameson et al., 2012), suggesting that WNT/ β -catenin canonical pathway was active
102 in PGCs and became inactivated as they differentiated into gonocytes and entered meiosis.
103 We next performed lineage-tracing experiments using tamoxifen-inducible *Axin2-CreERT2* line
104 (Wang et al., 2015) to activate the expression of the membrane-tagged GFP from the
105 *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* reporter (*mTmG*) (Muzumdar et al., 2007) (SupFig.1F)
106 at 9.5 dpc, which resulted in GFP-labelling of the germ cells at 13.5 dpc (Fig.1B). These
107 observations confirmed that WNT/ β -catenin signalling was active in post-migratory PGCs as
108 soon as they reached the developing gonad.

109

110 **β -catenin is efficiently depleted from PGCs in a germ cell-specific *Ctnnb1* loss-of-** 111 **function mouse model.**

112 The function of *Ctnnb1* gene (encoding β -catenin), initially evidenced by *Rspo1* knockout in
113 the whole XX gonad (Chassot et al., 2008b), has already been addressed in female somatic
114 cells using loss-of-function strategies (Chassot et al., 2011; Liu et al., 2009; Manuylov et al.,
115 2008). These independent studies have demonstrated that depletion of *Ctnnb1* in *Sf1*-positive
116 cells did impair neither germ cell proliferation nor meiosis initiation, suggesting that the activity
117 of canonical WNT signalling in germ cells is intrinsic. To investigate this hypothesis, we
118 generated a *Ctnnb1* specific loss-of-function in female PGCs. To do so, we employed mice
119 expressing the *Sox2^{tm1(cre/ERT)/Hoch}* (or *Sox2-CreER*) recombinase, *Sox2* being expressed in
120 pluripotent PGCs, which mice are viable and normally fertile (Gallardo et al., 2007). We then
121 bred heterozygous *Sox2-CreER* mice with mice expressing the *Ctnnb1^{tm2/Kem}* (or *Ctnnb1^{Flox}*)
122 alleles containing *loxP*-flanked sequences, which are viable, fertile, normal in size and do not
123 display any gross physical or behavioral abnormalities (Harada et al., 1999), to induce a
124 tamoxifen-inducible, *Cre*-mediated recombination that would result in deletion of the floxed
125 sequences in the CRE-expressing cells of the offspring (*Sox2-CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}*
126 animals)(SupFig.2A).

127 Conditional ablation of *Ctnnb1* in XX PGCs was induced by two tamoxifen treatments at 9.5
128 and 10.5 days *dpc* (SupFig.2A) and we checked that *Ctnnb1* deletion did not affect the size of
129 the animals (SupFig.2A) nor the somatic cell differentiation as evidenced by the expression of
130 FOXL2, a pre-granulosa cell marker, and the absence of SOX9 and AMH expression which
131 mark Sertoli cells at this stage of development (SupFig.2B). We first validated the knockout
132 strategy by using the *Sox2-CreER;Ctnnb1^{Flox}* line in combination with the *mTmG* reporter strain
133 that induces the expression of GFP in CRE-expressing cells upon tamoxifen treatment
134 (Muzumdar et al., 2007) (SupFig.3A). This resulted in GFP-labelling of almost 100% of the
135 germ cells 5 days after induction. In addition, both β -catenin and LEF1 nuclear staining were
136 lost from germ cell nuclei while their expression was still normally detected in surrounding
137 somatic cells (Fig.2). We then purified the PGCs by FACS from *Sox2-*
138 *CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox};mTmG* XX gonads at 12.5 *dpc*, checked for their purity (SupFig.5A,B)
139 and performed RT-QPCR measurements. *Axin2* mRNA levels were strongly reduced in PGCs
140 (SupFig.4A). All together, these observations indicate that β -catenin was efficiently depleted
141 from PGCs.

142

143 **β -catenin is required to ensure the proper timing of PGC differentiation.**

144 We next examined whether PGCs properly differentiate in absence of WNT/ β -catenin
145 signalling activity in *Sox2-CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}* embryonic gonads. We found that the mRNA
146 abundance of the pluripotency markers *Pou5f1* (*Oct3/4*), *Sox2* and *Nanog* was significantly
147 reduced in purified germ cells from 12.5 *dpc* gonads in absence of WNT/ β -catenin signalling
148 activity (SupFig.4A). This was accompanied by a decrease in *Cdh1* and an increase in *Piwil2*
149 and *Ddx4* mRNA expression levels in the mutant gonads, suggesting that PGCs precociously
150 differentiated in absence of canonical WNT signalling. The mRNA abundance of *Dazl*, a gene
151 encoding a germ cell-specific RNA binding protein (Seligman and Page, 1998), was
152 unchanged; nevertheless, DAZL activity might be regulated at a posttranscriptional level
153 (Maatouk et al., 2006). In addition, POU5F1-positive PGCs were less abundant in the mutant
154 gonad, with some DDX4-positive PGCs being devoid of POU5F1 while all PGCs were positive

155 for both markers in the control gonad (Fig.2), as quantified in SupFig.4B. We next studied the
156 expression of SSEA1 and POU5F1, and DAZL and DDX4 at 13.5 dpc. We found that the
157 number of SSEA1- or POU5F1- positive germ cells was significantly reduced from 45 to 25%
158 and from 40 to 15% of the germ cells respectively, while the number of DAZL- or DDX4-positive
159 germ cells was significantly increased (from 55 to 75% and from 60 to 85% of the germ cells
160 respectively, in the mutant gonads compared to the control gonad (Fig.2, SupFig.4B,C,D). We
161 verified that the observed loss of pluripotency in the mutant germ cells was not due to the
162 *Sox2-CreER* construct as evidenced by POU5F1 and SOX2 maintenance in Oil-treated *Sox2-*
163 *CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}* embryonic gonads (SupFig.3B). All together, our results demonstrate that
164 the absence of WNT/ β -catenin activity impaired germ cell pluripotency and triggered a
165 precocious differentiation of primordial germ cells, suggesting that β -catenin is required to
166 ensure the proper timing of the transition from PGCs to gametogenesis-competent cells.

167

168 **Genetic ablation of *Ctnnb1* impairs PGC proliferation and triggers a precocious meiosis** 169 **initiation.**

170 Between 12.5 and 13.5 dpc, XX PGCs become committed to oocyte development (Adams and
171 McLaren, 2002), exit from the mitotic cell cycle, proceed through the pre-meiotic S-phase
172 between 13.5 and 14.5 dpc and have accumulated in prophase I by 15.5 dpc (Miles and
173 Western, 2012). To assess whether abolishing WNT/ β -catenin signalling in PGCs caused them
174 to exit the cell cycle earlier than they did in control gonads, we performed immunostaining
175 using MKI67 antibody, which marks all stages of cell-cycle progression and we quantified the
176 number of MKI67-positive germ cells versus total germ cells (TRA98-positive) at 12.5 and 13.5
177 dpc (Fig.3A,B). This number was significantly decreased in the *Sox2-CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}*
178 gonads compared to the control ones, from 27.72% of the germ cells to 17.16% (p=0.000939).
179 This suggests that the germ cells have stop proliferating in the *Sox2-CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}*
180 gonads and that WNT/ β -catenin signalling is instructing the proper timing of the mitotic cell
181 cycle in PGCs. *Stra8* (Stimulated by Retinoic Acid 8 gene) is required for progression through
182 S-phase prior to entry into prophase 1. This is evidenced by the failure of pre-meiotic DNA

183 replication in female *Stra8*-deficient gonads (Anderson et al., 2008). To investigate whether
184 germ cells could precociously enter meiosis in the mutant gonads, we examined by RT-qPCR
185 and *in situ* hybridization analyses the expression pattern of *Stra8* at 12.5 dpc, when it is not
186 detected yet in the developing ovary, and at 13.5 dpc when *Stra8* starts to be normally
187 expressed (Fig.3C, D). *Stra8*-positive germ cells were already present in the *Sox2-
188 CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}* ovaries at 12.5 whereas *Stra8* was not detected before 13.5 dpc in the
189 control gonad, indicating that PGCs have developed as oocytes and precociously initiated
190 meiosis. Histological analyses performed at 18.5 dpc revealed that while all the germ cells
191 were in pachytene stage in the control gonads, germ cells exhibited a fragmented nucleus or
192 presented nuclear aggregates in the *Sox2-CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}* gonads, suggesting that they
193 were eventually undergoing apoptosis (Fig.3E). Collectively, these results demonstrated that
194 genetic ablation of *Ctnnb1* impaired PGC proliferation and thus precociously engaged germ
195 cells from the replicative cell division (mitosis) to meiosis.

196

197 **β -catenin stabilization through GSK3 β ablation leads to the maintenance of pluripotency** 198 **in PGCs.**

199 In the resting state, cytosolic and nuclear pools of β -catenin must be maintained at a very low
200 level through rapid turnover of free β -catenin, that is executed by a multi-protein complex, the
201 β -catenin destruction complex (reviewed in (Wu and Pan, 2010)). GSK3 β , a central component
202 of this complex, mediates β -catenin phosphorylation, thus triggering its destabilization and
203 eventually leading to its degradation by the 26S proteasome (Peifer and Polakis, 2000). Thus,
204 GSK3 β -mediated degradation of β -catenin is known to be a key event in WNT/ β -catenin
205 signalling. We next investigated GSK3 β pattern of expression in the developing ovary.
206 Immunostaining experiments revealed that GSK3 β was detected in the cytoplasm of both germ
207 cells and somatic cells in the ovary at 13.5 dpc (Fig.4A), suggesting that GSK3 β -mediated
208 regulation of β -catenin levels was active in both cell types. We next assumed that a genetic
209 ablation of GSK3 β might ectopically stabilize β -catenin. Indeed, we observed that LEF1
210 expression was strongly reinforced while GSK3 β expression was efficiently lost in *Gsk3 β ^{-/-}*

211 ovaries compared to their control littermates (Fig.4A). Moreover, CDH1 expression at the cell
212 membrane was also reinforced in the mutant gonad. In addition, mRNA levels of *Axin2*,
213 quantified by RT-qPCR, were upregulated in the *Gsk3β*^{-/-} gonads compared to the control ones
214 (Fig.4B). We concluded that genetic ablation of *Gsk3β* ectopically maintained WNT/β-catenin
215 signalling activity. We next investigated whether PGCs properly exited from pluripotency and
216 differentiated in absence of *Gsk3β*. The expression levels of *Pou5f1*, *Sox2* and *Nanog* mRNA
217 were significantly increased in the mutant gonads compared to the control ones at 13.5 dpc
218 (Fig.4B), and this was accompanied by an increase in the number of POU5F1 and SSEA1-
219 positive germ cells in absence of *Gsk3β* (Fig.4C, SupFig.6A,B). Moreover, to assess whether
220 stabilizing WNT/β-catenin signalling caused germ cells to keep proliferating longer than they
221 did in control ovaries, we injected Bromo-deoxyUridine (BrdU) over a 3 hour-frame and
222 quantified the number of BrdU-positive germ cells versus total germ cells. This number was
223 significantly increased in the mutant ovaries compared to the wild-type ones (SupFig.6C).
224 Altogether, this indicate that, in contrast to what we observed in *Sox2-CreER;Ctnnb1*^{Flox/Flox}
225 mutant embryos, β-catenin stabilization led to the maintenance of pluripotency in PGCs, which
226 prevented them to differentiate as they normally did in the control gonads.

227

228 **In absence of WNT/β-catenin signalling, POU5F1 is localized at the membrane of germ**
229 **cells.**

230 There is *in vitro* evidence that POU5F1 can be localized in protein complexes associated with
231 cell membrane, which presence correlates with ground-state pluripotency of cultured mESCs
232 (Faunes et al., 2013). To understand the reasons for the loss of pluripotency of PGCs in
233 absence of β-catenin, we carefully analyzed POU5F1 localization in control and in *Sox2-*
234 *CreER;Ctnnb1*^{Flox/Flox} germ cells. While POU5F1 was detected in the nucleus of all the control
235 germ cells at 12.5 dpc, some of the germ cells (32%, p=0.011) expressed POU5F1 at the
236 membrane in the mutant ovaries and this was reinforced at 13.5 dpc with almost 82% of the
237 germ cells expressing POU5F1 at the membrane in the mutant gonads versus 31% in the
238 control gonads (p = 0,000027)(Fig.5A,B,C).

239 We next investigated whether POU5F1 premature relocalization at the cell membrane in
240 absence of β -catenin would impair the expression of POU5F1 direct target genes. To do so,
241 we quantified mRNA levels of *Pou5f1* itself, *Cdx2* and *Dppa3*, which have been shown to be
242 positively upregulated by POU5F1 in human and mouse ES cell line (Babaie et al., 2007;
243 Levasseur et al., 2008) and are expressed in PGCs (Bowles, 2003; Bialecka, 2012). *Pou5f1*,
244 *Dppa3* and *Cdx2/CDX2* levels were significantly downregulated in the *Sox2-*
245 *CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}* germ cells at 13.5 dpc (Fig.5D,E), suggesting that POU5F1
246 transcriptional activity was compromised in the *Sox2-CreER;Ctnnb1^{Flox/Flox}* germ cells.

247

248 **POU5F1 and β -catenin associate in multiproteic complexes during germ cell** 249 **differentiation.**

250 To get further insight into β -catenin mechanism of action, we carefully investigate the
251 expression pattern of POU5F1 and β -catenin by confocal microscopy during germ cell
252 differentiation *in vivo*. Whereas both of them were localized in the nucleus of primordial germ
253 cells at 12.5 dpc, they were exclusively detected at the cell membrane at 14.5 dpc (Fig.6A).
254 Because β -catenin signalling is also active in the surrounding somatic cells as previously
255 described (Chassot et al., 2011; Chassot et al., 2008b), we next purified germ cells from 13.5
256 dpc gonads by FACS and cultured them for 24 hours in absence (control) or in presence of
257 either 2.5 or 5 μ M of CHIR99021, a potent pharmacological activator of the WNT signalling
258 pathway that is acting by inhibiting GSK3 β activity (Bain et al., 2007). High concentrations of
259 CHIR99021 (i.e. 5 μ M) have been described to promote ES cell differentiation while lower
260 doses (i.e. 2.5 μ M) are usually used to maintain them undifferentiated (Lian et al., 2013; Ying
261 et al., 2008). We then analyzed by confocal microscopy POU5F1 and β -catenin cellular
262 localization in the isolated germ cells. In control conditions, POU5F1 and β -catenin were co-
263 expressed at the germ cell membrane. However, when the germ cells were incubated in 2.5
264 μ M CHIR99021, POU5F1 and β -catenin were localized in the nucleus of the germ cells as they
265 did in 12.5 dpc embryonic gonads *in vivo*, while they were together expressed at the germ cell

266 membrane in differentiating conditions using 5 μ M CHIR99021 (Fig.6B). These observations
267 further indicate that POU5F1 and β -catenin were shuttling from the nucleus to the cell
268 membrane depending on WNT/ β -catenin signalling activation levels. Next we investigated
269 whether POU5F1 and β -catenin were physically interacting. To do so, we performed
270 immunoprecipitation experiments on protein extracts from 12.5 and 14.5 dpc gonads, using a
271 POU5F1-specific antibody. At 12.5 dpc, POU5F1 was efficiently immunoprecipitated and
272 weakly associated with β -catenin (Fig.6D). In contrast, at 14.5 dpc, β -catenin strongly co-
273 immunoprecipitated with POU5F1 and these β -catenin-POU5F1 complexes were associated
274 with cell membranes as evidenced by CDH1 co-immunoprecipitation (Fig.6E). Taken together,
275 these observations indicate that β -catenin and POU5F1 associated in the germ cells and
276 transited from nucleus to cell membrane during germ cell differentiation *in vivo*.

277

278 **ZNRF3 is required for proper germ cell differentiation.**

279 Balancing adequate levels of WNT activity is crucial during development, and positive- and
280 negative-feedback regulators govern WNT/ β -catenin signalling activity. We have shown that
281 WNT/ β -catenin canonical signalling is activated by RSPO1 in the fetal ovary (Chassot et al.,
282 2011; Chassot et al., 2008b), and that this pathway must be finely turned off to ensure proper
283 gonadic development (Chassot et al., 2017; De Cian et al., 2017). Among the negative
284 regulators, the related transmembrane E3 ubiquitin ligases ZNRF3 and RNF43 selectively
285 ubiquitinate Frizzled receptors, thereby targeting these WNT receptors for degradation (Koo
286 et al., 2012). In the gonad, ZNRF3 is required for male sex determination and both XY mice
287 lacking *Znrf3*, that ectopically activate WNT/ β -catenin signalling, and human patients
288 eventually exhibit sex reversal or various disorders of sexual development (Harris et al., 2018).
289 To determine whether ZNRF3 is negatively regulating WNT/ β -catenin signalling in the germ
290 cells to ensure their differentiation, we first investigated *Znrf3* pattern of expression in the XX
291 gonads by RNAscope technology. We found that while about 25% of the germ cells expressed
292 *Znrf3* at 12.5 dpc, this percentage increased until reaching 75% at 14.5 dpc (Fig.7A). The
293 concomitant upregulation of *Znrf3* expression and down-regulation of the activation of WNT/ β -

294 catenin pathway suggest that *Znrf3* is negatively regulating WNT/ β -catenin activity in the
295 differentiating germ cells. We next examined whether the germ cells properly differentiated in
296 absence of *Znrf3*. As *Znrf3* is strongly expressed in the ovarian somatic cells (Fig.7A), we first
297 checked that the supporting cells of the *Znrf3*^{-/-} mutant ovary did not expressed male markers
298 such as SOX9 and normally expressed female markers such as FOXL2, indicating that they
299 were normally differentiated (Fig.7B). However, in the *Znrf3*^{-/-} gonads, the majority of the germ
300 cells maintained POU5F1 expression and they did not enter meiosis as evidenced by lack of
301 SCP3 expression at 13.5 dpc compared to the germ cells in the control gonads (Fig.7C).
302 Finally, we found that *Znrf3* mRNA levels were upregulated in *Sox2-CreER;Ctnnb1*^{Flox/Flox} germ
303 cells at 12.5 and 13.5 dpc, indicating that ZNRF3 depends on WNT/ β -catenin signalling in the
304 differentiating germ cells (Fig.7E). Taken together, our results reveal that ZNRF3, which
305 expression depends on WNT/ β -catenin activity, is required for germ cell proper differentiation
306 by down-regulating WNT/ β -catenin signalling in a negative feedback loop taking place between
307 12.5 and 14.5 dpc, thus allowing germ cells to exit pluripotency.

308

309

310 DISCUSSION

311

312 WNT/ β -catenin signalling pathway is activated in female germ cells during embryonic
313 development (Chassot et al., 2011). Evidence that WNT/ β -catenin signalling activity has to be
314 finely tuned over time in male germ cells to ensure spermatogenesis (Chassot et al., 2017;
315 Takase and Nusse, 2016) prompted us to investigate the window and the mechanism of action
316 of WNT/ β -catenin in oogenesis. In all three distinct genetic models that we used, either to
317 deplete *Ctnnb1* from the PGCs (*Sox2-CreER;Ctnnb1*^{Flox/Flox} mice) or to stabilize its expression
318 in the gonad (*Gsk3 β* and *Znrf3* knock-out mice), we observed that WNT/ β -catenin activity was
319 closely related to POU5F1 expression, localization and activity. Moreover, we show, for the first
320 time in the physiological conditions of the developing ovary, that β -catenin and POU5F1 formed
321 multiproteic complexes that shuttled from the nucleus to the membrane of the germ cells while

322 they differentiated, thus decreasing the expression of POU5F1 target genes, exiting the
323 pluripotent state and allowing germ cell differentiation to occur.

324

325 Nevertheless, the phenotype that we describe in the germ cell-specific *Ctnnb1*-loss of function
326 model diverges from the one that we reported using the mutants deficient for *Rspo1*, a
327 physiological agonist of WNT signalling (Chassot et al., 2011). Hence, in the XX *Rspo1*^{-/-}
328 gonad, the majority of the primordial germ cells maintained POU5F1 expression and failed to
329 express *Stra8* and SCP3, whereas the *Ctnnb1*-deleted germ cells lost POU5F1 expression
330 and prematurely expressed *Stra8*. However, *Rspo1* genetic ablation globally affects both
331 somatic and germ cells as soon as the gonad is forming. The consequences of this mutation
332 on germ cells might also reflect the abnormal differentiation of the surrounding somatic cells
333 and modify the molecular crosstalk between these two cell types, whereas the somatic
334 environment normally differentiated in the *Sox2-CreER;Ctnnb1*^{Flox/Flox} gonad. Interestingly, in
335 XY germ cells, the NODAL/Activin A signalling, which is activated by the secretion of FGF9
336 from the somatic cells, is involved in determining the window of germ cell differentiation and
337 loss of pluripotency, thus promoting male germ cell fate (Souquet et al., 2012; Spiller et al.,
338 2012; Wu et al., 2016). It would be of interest to investigate whether NODAL/Activin A signalling
339 pathway is ectopically activated in *Rspo1*-loss of function mutants, which would further argue
340 that in these conditions, germ cells already adopted a male fate, as evidenced by *Nanos2*
341 expression (Chassot et al., 2011). In contrast, the germ cells did not change their sexual fate
342 in absence of *Ctnnb1* but rather accelerated their differentiation as they prematurely expressed
343 *Stra8*.

344

345 Interestingly, we have previously shown that the genetic ablation of *Rspo1* accelerates the
346 differentiation of pre-granulosa cells in mature granulosa cells that eventually transdifferentiate
347 into Sertoli-like cells (Maatouk et al., 2013). In light of the results we gathered in the present
348 study, we propose that WNT/ β -catenin pathway is a gatekeeper determining the proper
349 window of differentiation in both somatic and germ cells and coordinates the development of

350 the different cell types of the fetal ovary. In this model, RSPO1, secreted by the somatic cells
351 of the developing ovary, directly activates the WNT/ β -catenin signalling pathway in the somatic
352 cells (Chassot et al., 2008b) and in the germ cells ((Chassot et al., 2011) and the present
353 work). In the primordial germ cells, β -catenin associates with POU5F1 in the nucleus to
354 maintain pluripotency as soon as ZNRF3 becomes expressed and inhibits WNT/ β -catenin
355 activation, thus triggering POU5F1 exit from nucleus and germ cell differentiation (SupFig.7).
356 The nature of the loci that are depending on β -catenin/POU5F1 activity requires further
357 investigations.

358

359 *Primordial germ cells and pluripotent stem cells share common features such as alkaline*
360 *phosphatase activity, expression of pluripotency factors such as Pou5f1, Nanog, Sox2 and*
361 *others, and capacity to be reprogrammed in vitro. An abundant literature describes the*
362 *regulation by WNT/ β -catenin signalling of the maintenance and exit from the pluripotency state*
363 *in stem cells, with various effects mostly depending on the culture conditions (Wray and*
364 *Hartmann, 2012).*

365 *Hence, the WNT/ β -catenin pathway prevents the exit from pluripotency in mouse embryonic*
366 *stem cells (mESCs) and inhibits their differentiation into more advanced epiblast stem cells*
367 *(EpiSCs) in vitro (ten Berge et al., 2011). In this model, pharmacological inhibition of*
368 *endogenous WNT signalling resulted in the differentiation of different ES cell lines, while*
369 *addition of WNT3A protein rescued these effects. In agreement, in Ctnnb1-deficient murine ES*
370 *cells, stemness is impaired while activation of the WNT/ β -catenin signalling by LiCl prolongs*
371 *the expression of pluripotency genes such as Pou5f1, Nanog, Dppa4-5 and others, and delays*
372 *the differentiation into embryoid bodies (Anton et al., 2007).*

373 *Interestingly, it has been previously shown that β -catenin and POU5F1 can interact (Faunes et*
374 *al., 2013; Kelly et al., 2011). In WNT3A-conditioned medium, β -catenin and POU5F1 associate*
375 *in mESCs, enhancing POU5F1 activity, eventually inhibiting neural differentiation and*
376 *prolonging retention of pluripotency (Kelly et al., 2011). Moreover, Faunes and colleagues*
377 *provided biochemical evidence, using cell culture systems, that β -catenin regulates mESC*

378 pluripotency by forming complexes with POU5F1 (OCT3/4) in tight association with the cell
379 membrane (Faunes et al., 2013). Our results demonstrate that a similar mechanism also exists
380 *in vivo* during germ cell differentiation, thus providing for the first time a molecular explanation
381 for the transition from undifferentiated germ cells to gonocytes, that eventually will be able to
382 sustain gametogenesis.

383

384 It has been shown that the primordial germ cells in the human fetal ovary also express
385 pluripotency markers such as POU5F1, NANOG, SSEA1 and other, which expression is lost
386 as soon as germ cells enter meiosis (Kerr et al., 2008), indicating that mouse and human
387 developing ovaries share identical features. *Germ cell tumours (GCTs), which are*
388 *predominantly diagnosed in young patients, i.e. in neonates, infants and adolescents, are*
389 *closely mimicking normal germ cell embryonic development and express pluripotency markers*
390 *such as POU5F1 or NANOG (Oosterhuis and Looijenga, 2019). These observations led to the*
391 *idea that GCTs originate from germ cells that have retained or reactivated their embryonic*
392 *pluripotency and self-renewal properties (Atlasi et al., 2014). WNT/ β -catenin pathway is one of*
393 *the major regulators of stemness and cancer. Even GCTs exhibit a large heterogeneity, it is*
394 *worth to note that cancer germ cells were often found to express β -catenin and CDH1, which*
395 *correlated with the degree of differentiation of the tumour (Honecker et al., 2004). Thus, the*
396 *precise role of β -catenin signalling and its involvement in the etiology of GCTs warrants further*
397 *investigation, and characterizing its interactions with POU5F1 in such pathophysiological*
398 *conditions may serve as a predictive factor.*

399

400

401 **ACKOWLEGMENTS**

402 The microscopy was done at MICA facility and the histological experiments were done at the
403 "Experimental Histopathology Platform" – IBV- CNRS UMR 7277- INSERM U1091-UNS. The
404 help of Maeva Gesson, Simon Lachambre and Samah Rekima is acknowledged. This work

405 was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV2-0017-
406 02 ARGONADS & ANR-11-LABX-0028-01) and Canceropole PACA (Emergence). MLR was
407 supported by a fellowship from La Ligue Nationale contre le Cancer.

408

409

410 **FIGURE LEGENDS**

411

412 **Figure 1: WNT/ β -catenin signalling is activated in post-migratory PGCs.**

413 A. Upper panel: Immunodetection of POU5F1 (OCT3/4) (red) and β -catenin (green) in 11.5,
414 12.5, 13.5 and 14.5 *dpc* ovaries. Middle panel: Immunodetection of DAZL (red), LEF1 (green)
415 and SSEA1 (FUT4) (white) in 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 *dpc* ovaries. Lower panel:
416 Immunodetection of SOX2 (red) and CDH1 (green) in 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 *dpc* ovaries.
417 DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 micrometers.

418 B. Immunodetection of POU5F1 (OCT3/4) (red) and GFP (green) in 13.5 *dpc* control and
419 *Axin2-CreERT2 ; Rosa26^{mTmG/mTmG}* ovaries. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or 25
420 micrometers.

421

422 **Figure 2: β -catenin is required for primordial germ cell differentiation.**

423 A. Immunodetection of β -catenin (red) and TRA98 (germ cells, green) (upper panel) and CDH1
424 (red) and LEF1 (green) (lower panel) in 13.5 *dpc* control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER ;*
425 *Ctnnb1^{flox/flox}* ovaries. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or 20 micrometers.

426 B. Upper panel: Immunodetection of POU5F1 (red) and DDX4 (germ cells, green) in 12.5 and
427 13.5 *dpc* control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}* ovaries. Lower panel:
428 Immunodetection of DAZL (red) and SSEA1 (white) in 13.5 *dpc* control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and
429 *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}* ovaries. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or 20
430 micrometers.

431

432 **Figure 3: Genetic ablation of *Ctnnb1* impairs PGC proliferation and triggers a**
433 **precocious meiosis initiation.**

434 A. Immunodetection of MKI67 (proliferating cells, red) and TRA98 (germ cells, green) in 12.5
435 and 13.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}) and *Sox2-CreER* ; *Ctnnb1*^{flox/flox} ovaries. DAPI (blue):
436 nuclei. Scale bars (white): 50 or 20 micrometers.

437 B. Histograms: quantification of the percentage of both MKI67- and TRA98-positive cells (i.e.
438 proliferating germ cells) in 12.5 and 13.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}, gray) and *Sox2-CreER* ;
439 *Ctnnb1*^{flox/flox} (dotted gray) ovaries. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM, **
440 $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

441 C. RT-qPCR analysis of *Stra8* expression in 12.5 and 13.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}, dark
442 gray) and *Sox2-CreER* ; *Ctnnb1*^{flox/flox} (pale gray) ovaries. Student's *t*-test, unpaired. Bars
443 represent mean +SEM, $n = 10$ individual gonads. *** $p < 0.001$; ns not significant.

444 D. *In situ* hybridization using *Stra8* riboprobe at 12.5 and 13.5 dpc in control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}, left
445 panel) and *Sox2-CreER* ; *Ctnnb1*^{flox/flox} (mutant, right panel) ovaries. Scale bars (black): 50
446 micrometers.

447 E. Haematoxylin & Eosine staining of 18.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}, left panel) and *Sox2-*
448 *CreER* ; *Ctnnb1*^{flox/flox} (mutant, right panel) ovaries. Scale bars (black): 50 micrometers. Arrows:
449 abnormal germ cells.

450

451 **Figure 4: β -catenin stabilization through $GSL3\beta$ ablation leads to the maintenance of**
452 **pluripotency in PGCs.**

453 A. Immunodetection of $GSK3\beta$ (red) and TRA98 (germ cells, green), and CDH1 (red) and LEF1
454 (green) in 13.5 dpc control and $GSK3\beta^{-/-}$ ovaries. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50
455 or 20 micrometers.

456 B. RT-qPCR analysis of *Axin2*, *Cdh1*, *Pou5f1*, *Sox2* and *Nanog* expression in 13.5 dpc control
457 (dark gray) and $GSK3\beta^{-/-}$ (dotted gray) ovaries. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent
458 mean +SEM, $n = 10$ individual gonads. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

459 C. Immunodetection of POU5F1 (red) and DDX4 (green), and DAZL (red) and SSEA1 (FUT4,
460 white) in 13.5 dpc control and *GSK3β*^{-/-} ovaries. Scale bars (white): 50 or 20 micrometers.

461

462 **Figure 5: In absence of WNT/β-catenin signalling, POU5F1 is localized at the membrane**
463 **of germ cells.**

464 A. Immunodetection of POU5F1 (red) in 12.5 and 13.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}) and *Sox2-*
465 *CreER* ; *Ctnnb1*^{flox/flox} ovaries. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or 20 micrometers.

466 B and C. Histograms: quantification of the percentage of nuclear (gray) and membranar (dotted
467 gray) POU5F1-positive cells in 12.5 and 13.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}, gray) and *Sox2-*
468 *CreER* ; *Ctnnb1*^{flox/flox} (dotted gray) ovaries. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean
469 +SEM. * *p*<0.05 and *** *p*<0.001.

470 D. RT-qPCR analysis of *Pou5f1*, *Cdx2* and *Dppa3* (*Stella*) expression in 13.5 dpc control
471 (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}, gray) and *Sox2-CreER* ; *Ctnnb1*^{flox/flox} (dotted gray) ovaries. Student's *t*-test,
472 unpaired. Bars represent mean +SEM, n = 10 individual gonads. ** *p*<0.01; *** *p*<0.001.

473 E. Immunodetection of CDX2 (red) and DDX4 (green) in 13.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}) and
474 *Sox2-CreER* ; *Ctnnb1*^{flox/flox} ovaries. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or 20
475 micrometers. Right panel: Histograms: quantification of the percentage of CDX2-positive cells
476 versus DDX4-positive germ cells in 13.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}, gray) and *Sox2-CreER* ;
477 *Ctnnb1*^{flox/flox} (dotted gray) ovaries. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM. ***
478 *p*<0.001.

479

480 **Figure 6: POU5F1 and β-catenin associate in multiproteic complexes during germ cell**
481 **differentiation.**

482 A. Immunodetection of POU5F1 (red) and β-catenin (green) in 12.5 and 14.5 wild-type ovaries.
483 DAPI (blue): nuclei. Arrows highlight examples of POU5F1 and β-catenin colocalization.

484 B. Brightfield picture of purified germ cells from 13.5 dpc wild-type gonads after 24 hours of
485 culture in control conditions.

486 C. Immunodetection of POU5F1 (red) and β -catenin (green) (confocal microscopy and Z-stack
487 projection) in purified germ cells from 13.5 dpc wild-type gonads after 24 hours of culture in
488 either control conditions (DMSO), 2.5 μ M CHIR99021 or 5 μ M CHIR99021.

489 D and E. Immunodetection by western blot of β -catenin, POU5F1, CDH1 and GAPDH directly
490 in protein lysate ("input"), or in pellets after immunoprecipitation with control IgG ("control IP")
491 or with POU5F1-raised specific antibody ("POU5F1 IP"), or in immunoprecipitation supernatant
492 ("supernatant"), at 12.5 (D) and 14.5 (E) dpc ovaries.

493

494 **Figure 7: ZNRF3 is required for proper germ cell differentiation.**

495 A. RNAscope *In situ* hybridization using *Znrf3* riboprobe (red) and immunodetection of DAZL
496 (green) in 12.5 and 14.5 dpc wild-type ovaries. Right panel: Histograms: quantification of the
497 percentage of *Znrf3*-DAZL double positive cells versus DAZL-positive cells in 12.5 (gray) and
498 14.5 (dotted gray) dpc ovaries. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM. ***
499 $p < 0.001$.

500 B. Immunodetection of SOX9 (red) and FOXL2 (green) in 13.5 dpc XY, XX control and *Znrf3*^{-/-}
501 gonads. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or 25 micrometers.

502 C. Immunodetection of POU5F1 (red) and SCP3 (green) in 13.5 dpc XY, XX control and *Znrf3*^{-/-}
503 gonads. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or 25 micrometers.

504 E. RT-qPCR analysis of *Znrf3* expression in 12.5 and 13.5 dpc control (*Ctnnb1*^{Flox/Flox}, pale
505 gray) and *Sox2-CreER*; *Ctnnb1*^{flox/flox} (dotted dark gray) ovaries. Student's *t*-test, unpaired.
506 Bars represent mean +SEM, n = 10 individual gonads. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

507

508 **Supplemental Figure 1: WNT/ β -catenin signalling is activated in post-migratory PGCs.**

509 A. Histograms: Quantification of POU5F1 (pale gray)-, nuclear β -catenin (dark gray)- and
510 LEF1-(dotted gray) positive cells versus total germ cells (%) in 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 dpc
511 ovaries after immunodetection (Fig.1A). Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean
512 +SEM. ns: not significant, *** $p < 0.001$.

513 B. Histograms: Quantification of SSEA1-positive cells (pale gray), DAZL-positive cells (dark
514 gray) and SSEA and DAZL-double positive cells (dotted gray) versus total germ cells (%) in
515 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 dpc ovaries after immunodetection (Fig.1A). Student's *t*-test,
516 unpaired. Bars represent mean +SEM. ns: not significant, *** $p < 0.001$.

517 C. Histograms: Quantification of SOX2-positive cells (pale gray), CDH1-positive cells (dark
518 gray) and SOX2 and CDH1-double positive cells (dotted gray) versus total germ cells (%) in
519 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 dpc ovaries after immunodetection (Fig.1A). Student's *t*-test,
520 unpaired. Bars represent mean +SEM. ns: not significant, *** $p < 0.001$.

521 D. RT-qPCR analysis of *Axin2*, *Lef1*, *Cdh1*, *Sox2*, *Pou5f1*, *Nanog*, *Dppa3 (Stella)*, *Ddx4*, *Dazl*
522 and *Piwil2* expression in the whole gonads of 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 dpc embryos. Student's
523 *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM, $n = 10$ individual gonads. ns: not significant; **
524 $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

525 E. RT-qPCR analysis of *Lef1* expression in purified germ cells from 12.5 and 14.5 dpc ovaries.
526 Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM, $n \approx 30\ 000$ germ cells FACS-purified
527 from 20 individual gonads. ** $p < 0.01$.

528 F. Left panel: genetic construct used in Fig.1B to trace GFP-positive cells using the *Axin2*-
529 *CreERT2* and the *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* CRE-reporter line. Right panel:
530 Protocol of induction of *Axin2-CreERT2* (9.5 dpc onwards). TAM: Tamoxifen.

531

532 **Supplemental Figure 2: *Ctnnb1* deletion in the primordial germ cells did not affect the**
533 **size of the animals nor the somatic cell differentiation.**

534 A. Upper left panel: genetic construct used in Fig.2 to specifically and conditionally delete
535 *Ctnnb1* (encoding β -catenin) in the primordial germ cells using the *Sox2^{tm1(cre/ERT)/Hoch}* (or *Sox2*-
536 *CreER*) line. Right panel: Protocol of induction of *Sox2-CreER* (9.5 and 10.5 dpc onwards).
537 TAM: Tamoxifen. Lower panel: Macroscopic view of a 13.5 dpc litter containing control
538 (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER*; *Ctnnb1^{flox/flox}* (black asterisks) embryos displaying any major
539 physical abnormalities and normal size.

540 B. Upper panel: Immunodetection of CDH1 (germ cells, red) and FOXL2 (pre-granulosa cells,
541 green) in 13.5 dpc control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}* ovaries. Lower panel:
542 Immunodetection of SOX9 (male somatic cells, red), AMH (male somatic cells, white) and
543 TRA98 (germ cells, green) in 13.5 dpc control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}*
544 ovaries. Inset: 13.5 dpc XY embryonic gonad used as a positive control for SOX9 and AMH
545 expression. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or 20 micrometers.

546

547 **Supplemental Figure 3: Validation of the *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}* mouse model for**
548 **germ cell-specific deletion of *Ctnnb1*.**

549 A. Upper panel: genetic construct used to validate the *Sox2-CreER* efficiency in germ cells, by
550 performing lineage tracing of GFP-positive cells using the *Sox2-CreER* crossed with the
551 *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* CRE-reporter line. Right panel: Protocol of induction of
552 the *Sox2-CreER* (9.5 and 10.5 dpc onwards). TAM: Tamoxifen. Lower panel: Immunodetection
553 of TRA98 (germ cells, red) and GFP (green) in 13.5 dpc control (*Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-}*
554 *EGFP)Luo*) and *Sox2-CreER ; Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* ovaries. DAPI (blue): nuclei.
555 Scale bars (white): 50 or 25 micrometers.

556 B. Immunodetection of CDH1 (germ cells, red) and SOX2 (green) (upper panel) and POU5F1
557 (red) (lower panel) in 13.5 dpc control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}* ovaries,
558 either treated with Tamoxifen or with Oil (vehicle). DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50
559 or 20 micrometers.

560

561 **Supplemental Figure 4: β -catenin is required for primordial germ cell differentiation.**

562 A. RT-qPCR analysis of *Axin2*, *Cdh1*, *Pou5f1*, *Sox2*, *Nanog*, *Ddx4* and *Piwil2* expression in
563 purified germ cells from 12.5 dpc control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*)(dark gray) and *Sox2-CreER ;*
564 *Ctnnb1^{flox/flox}* (pale gray) ovaries. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM, $n \approx$
565 30 000 germ cells FACS-purified from 20 individual gonads. *** $p < 0.001$.

566 B and C. Histograms: Quantification of DDX4-positive cells (pale gray) and POU5F1-DDX4
567 double positive cells (dotted gray) (%) in control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}*

568 ovaries from 12.5 (B) and 13.5 dpc (C) embryos after immunodetection (Fig.2). Student's *t*-
569 test, unpaired. Bars represent mean +SEM. ns: not significant, *** $p < 0.001$.

570 D. Histograms: Quantification of DAZL-positive cells (pale gray) and SSEA1-DAZL double
571 positive cells (dotted gray) (%) in control (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}*
572 ovaries from 13.5 dpc embryos after immunodetection (Fig.2). Student's *t*-test, unpaired. Bars
573 represent mean +SEM. *** $p < 0.001$.

574

575 **Supplemental Figure 5: Validation of the purity of germ cell population collected after**
576 **Fluorescence-Activated Cell Sorting.**

577 A. Schematic representation of the protocol used to isolate germ cells by FACS from control
578 (*Ctnnb1^{Flox/Flox}*) and *Sox2-CreER ; Ctnnb1^{flox/flox}* ovaries, based on GFP-positive cell sorting
579 after CRE activation by Tamoxifen.

580 B. Left panel: Fluorescence-Activated Cell Sorting using GFP immunostaining to identify germ
581 cells (GFP-positive) from the whole gonadal cell types. The gating strategy is indicated by the
582 circle around GFP-positives cells.

583 C. RT-qPCR analysis of *Ddx4* (germ cells) and *Follistatin* (*Fst*, marker for female somatic cells)
584 expression in cDNA from either 12.5 dpc whole ovaries, FACS-purified germ cells or somatic
585 cells from 12.5 dpc ovaries. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM, $n = 3$
586 replicates. *** $p < 0.001$.

587

588 **Supplemental Figure 6: β -catenin stabilization through $GSL3\beta$ ablation leads to the**
589 **maintenance of pluripotency and proliferation in PGCs.**

590 A. Histograms: Quantification of DDX4-positive cells (pale gray) and POU5F1-DDX4 double
591 positive cells (dotted gray) (%) in control and *Gsk3 β ^{-/-}* ovaries from 13.5 dpc embryos after
592 immunodetection (Fig.4). Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM. *** $p < 0.001$.

593 B. Histograms: Quantification of DAZL-positive cells (pale gray) and SSEA1-DAZL double
594 positive cells (dotted gray) (%) in control and *Gsk3β*^{-/-} ovaries from 13.5 dpc embryos after
595 immunodetection (Fig.4). Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM. *** p<0.001.
596 C. Upper panel: Immunodetection of DDX4 (germ cells, red) and BrdU (proliferating cells,
597 green) in 13.5 dpc control and *Gsk3β*^{-/-} ovaries. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 or
598 20 micrometers. Lower panel: Histograms: Quantification of BrdU-positive cells (proliferating
599 cells, pale gray), DDX4-positive cells (germ cells, dark gray) and BrdU-DDX4 double positive
600 cells (proliferating germ cells, dotted gray) (%) in control and *Gsk3β*^{-/-} ovaries from 13.5 dpc
601 embryos. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM. ns: not significant; * p<0.05
602 ; ** p<0.01.

603

604 **Supplemental Figure 7: Proposed model for WNT/β-catenin mechanism of action during**
605 **germ cell exit from pluripotency and differentiation.**

606 In the primordial germ cells, WNT/β-catenin is activated by RSPO1 and β-catenin associates
607 with POU5F1 in the nucleus to maintain pluripotency as soon as ZNRF3 becomes expressed
608 and inhibits WNT/β-catenin activation, thus triggering POU5F1 exit from nucleus and female
609 germ cell differentiation.

610

611

612 **STAR METHODS**

613

614 **Mouse strains and genotyping**

615 The experiments described herein were carried out in compliance with the relevant institutional
616 and French animal welfare laws, guidelines and policies. All the experiments were approved
617 by the French ethics committee (Comité Institutionnel d'Ethique Pour l'Animal de Laboratoire;
618 number NCE-297). All mice were kept on a mix background 129/C57BL/6J. Mouse lines were
619 obtained from the Jackson Laboratory. The *Sox2*^{tm1^{(cre/ERT)/Hoch}} (or *Sox2-CreER*), *Ctnnb1*^{tm2^{Kem}}

620 (or *Ctnnb1^{Flox}*), *Znrf3^{Flox}*, *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Lox}*, *GSK3 β* and *Axin2-CreERT2*
621 mice were described previously and genotyped as reported (Arnold et al., 2011; Barrell et al.,
622 2012; Brault et al., 2001; Koo et al., 2012; Muzumdar et al., 2007; van Amerongen et al., 2012).
623 Genotyping was performed using DNA extracted from tail tips or ear biopsies of mice.
624 To activate the cre^{ERT} recombinase in embryos, TAM (cat T5648, Sigma-Aldrich) was directly
625 diluted in corn oil to a concentration of 40 mg/mL, and two tamoxifen (TAM) treatments (200
626 mg/kg body weight) were administrated to pregnant females by forcefeeding at 9.5 and 10.5
627 dpc. This resulted in embryos in which *Ctnnb1* was deleted upon TAM induction when they
628 were carrying the cre^{ERT} transgene as well as their control littermates. For proliferation assays,
629 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine (BrdU) (cat B5002, Sigma-Aldrich) was diluted to a concentration of
630 10 mg/mL in sterile H₂O, was administrated to the pregnant females at a final concentration
631 of 10 μ g/mL by intraperitoneal injection, and pregnant females and their embryos were
632 sacrificed after 3 hours.

633

634 **Quantitative PCR analyses (QPCR)**

635 Individual gonads without mesonephroi were dissected in Phosphate Buffered Saline (PBS)
636 from 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 dpc embryos. RNA was extracted using the RNeasy Qiagen kit,
637 and reverse transcribed using the RNA RT-PCR kit (Stratagene). Primers and probes were
638 designed by the Roche Assay Design Center
639 (<https://www.rocheappliedscience.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>). All real-time PCR assays were
640 carried out using the LC-Faststart DNA Master kit Roche according to the manufacturer's
641 instructions. QPCR was performed on cDNA from one gonad and compared to a standard
642 curve. QPCR were repeated at least twice. Relative expression levels of each sample were
643 quantified in the same run and normalized by measuring the amount of *Sdha* cDNA (which
644 represents the total gonadal cells).

645

646 **Statistical analysis**

647 For each genotype, the mean of the absolute expression levels (i.e. normalized) was calculated

648 and graphs of QPCR results show fold of change +SEM. All the data were analyzed by
649 unpaired two-sided Student's *t* test using Microsoft Excel. Asterisks highlight the pertinent
650 comparisons and indicate levels of significance: *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001. Data are
651 shown as mean + SEM.

652

653 **Histological analyses**

654 Fetal gonads were dissected, fixed in Bouin's solution overnight, and then embedded in
655 paraffin on the Experimental Histopathology Platform of iBV, CNRS UMR7277-INSERM
656 U1091-UNS. Microtome sections of 5 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin
657 (H&E) according to standard procedures. Pictures were taken with an MZ9.5 microscope
658 (Leica) coupled with a DHC490 camera (Leica) and Leica application suite V3.3.0 software,
659 and processed with Adobe Photoshop.

660

661 ***In-situ* Hybridization**

662 Samples were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde overnight and then processed for paraffin
663 embedding. Microtome sections of 7 µm thickness were processed for *in situ* hybridization.
664 *Stra8* digoxigenin-labelled riboprobe was synthesized and *in situ* hybridization analyses were
665 performed as described in (Chassot et al., 2011). Imaging was performed on MZ9.5
666 microscope (Leica) coupled with a DHC490 camera (Leica) and Leica application suite V3.3.0
667 software, and processed with Adobe Photoshop.

668 For RNAscope experiments, samples were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at
669 room temperature. Five µm sections were processed for RNA *in situ* detection using the
670 RNAscope 2.0 High Definition-RED Kit according to the manufacturer's instructions (ACDBio,
671 (Wang et al., 2012)). *Znrf3* probe was designed by ACDBio. Slides were counterstained with
672 DAPI diluted in the mounting medium at 10 µg/ml (Vectashield, Vector laboratories) to detect
673 nuclei, and with DAZL antibody to detect germ cells. RNAscope results were examined under
674 a confocal microscope Leica DM5500 TCS SPE on an upright stand (Leica Microsystems,
675 Mannheim, Germany), using an ACS APO 63X oil 1.3 NA objective. The lasers used were

676 diodes laser (405 nm, 488 nm and 532 nm). The microscope was equipped with a
677 galvanometric stage in order to do z-acquisitions.

678

679 **Immunological analyses**

680 Samples were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde overnight and then processed either for
681 paraffin embedding or directly for whole-mount immunostaining. Microtome sections of 5 μ m
682 thickness were processed for immunostaining. Immunofluorescence analyses were performed
683 as described in (Chassot et al., 2011). The following dilutions of primary antibodies were used:
684 CDH1 (cat 610182, BD Transduction Laboratories) 1:100, CDX2 (cat AM392, Biogenex),
685 1:200, CTNNB1 (cat, C2206, Sigma-Aldrich), 1:100, active CTNNB1 (ABC) (cat 05-665,
686 Millipore), 1:100, DAZL (cat GTX89448, Genetex) 1:200, DDX4/MVH (cat 13840, Abcam)
687 1:200, FOXL2 (cat 5096, Abcam), 1:300, GFP (cat TP401, Torrey Pines Biolabs), 1:750,
688 GSK3 β (cat 135653, Santa Cruz), 1:250, LEF1 (cat 137872, Abcam), 1:250, MKI67 (cat
689 M3062, Spring Bioscience), 1:150, POU5F1 (OCT3/4) (cat 611202, BD Transduction
690 Laboratories) 1:250, SCP3 (cat 15093, Abcam) 1:200, SOX2 (cat 97959, Abcam) 1:200, SOX9
691 (cat HPA001758, Sigma-Aldrich), 1:500, TRA98 (cat 82527, Abcam) 1:150, FUT4 (SSEA1)
692 (cat 21702, Santa Cruz) 1:200. Slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole
693 (DAPI) diluted in the mounting medium at 10 μ g/ml (Vectashield, Vector laboratories) to detect
694 nuclei. Imaging was performed with a motorized Axio Imager Z1 microscope (Zeiss) coupled
695 with an AxioCam Mrm camera (Zeiss) and images were processed with Axiovision LE and
696 ImageJ. ImageJ software was used for quantification of proliferating germ cells versus total
697 germ cells.

698 Cell imaging was performed with a Leica DM6000 TCS SP5 confocal microscope on an upright
699 stand (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), using objectives HC PL APO CORR 20X
700 multi immersion NA 0.7 and HCX APO L 63X oil 1.4 NA. The lasers used were argon laser
701 (488 nm), HeNe laser (543 nm) and diodes laser 405 nm. The microscope was equipped with
702 a galvanometric stage in order to do z-acquisitions, a resonant scanner and with an automated
703 xy stage for mosaic acquisitions.

704

705 **Immunodetection and quantification of proliferating germ cells**

706 Paraffin sections from each genotype were processed for immunohistological experiments with
707 TRA98 or DDX4 antibody. Then proliferation analysis was performed on the same sections by
708 way of either 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine labelling (3 hours of pulse) followed by detection using
709 an appropriate kit (cat 11 296 736 001, Roche), or MKI67 labelling. Total germ cells and
710 proliferating cells were quantified on the entire section using ImageJ software. For each
711 picture, the number of BrdU-positive germ cells or MKI67-positive (proliferating) and the
712 number of either OCT3/4 or DDX4-positive cells (total), were counted. Then the percentage of
713 BrdU-positive or MKI67-positive versus OCT3/4 or DDX4-positive germ cells, was determined.
714 For each genotype (n= 3 to 7; 15 pictures per genotype), the mean and mean +SEM of these
715 percentages were calculated and reported on a graph after statistical analysis (for details, see
716 paragraph Statistical Analysis above).

717

718 **Purification of germ cells from embryonic gonads**

719 Whole gonads from 13.5 dpc embryos were dissected, rinsed, pooled together according to
720 their genotype (10 embryos per genotype, i.e. \approx 30 000 germ cells per genotype), and digested
721 with a solution containing 80U Papain (cat P4762, Sigma-Aldrich), L-Cystein (cat C7352
722 Sigma-Aldrich), DNase (cat 11284932001, Roche) and RPMI medium (cat 12633012, Thermo
723 Fisher) supplemented with Napyr, EDTA and MEM, for 2.5 min at 37°C. The cell suspension
724 was spin down, and the final pellet resuspended in RPMI supplemented with 10% fetal bovine
725 serum (FBS). Germ cells were isolated by Fluorescence-Activated Cell Sorting. The sorts were
726 performed using a FACS ARIA sorter (BD Biosciences) equipped with fours lasers (405, 488,
727 561 and 633nm). We identified in *Sox2-CreER; Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* samples
728 all the GFP-positive cells with a 530/30 bandpass filter after excitation by the 488nm laser.
729 With a back gating, we have positioned the gate allowed to collect the cells based on the GFP-
730 staining. For all the experiments, we have applied the same settings on the instrument.
731 Germ cells were then seeded on coverslips coated with Poly-lysine (cat P4832, Sigma) in 24

732 well-plates. Germ cells were cultured with DMEM (cat 10567014, Thermo Fisher,) and were
733 treated with CHIR99021 (cat 4423/10, RnD Systems) for 24 hours. Germ cells were then fixed
734 for 15 minutes in PFA 4% at room temperature and stained with anti-POU5F1 antibody, as
735 described in the Immunofluorescence and histological analysis section.

736

737 **Protein extracts, immunoprecipitations and Western blot**

738 Preparation of cell lysates from whole gonads at 12.5 and 14.5 dpc, conditions for
739 immunoprecipitation and immunoblotting were carried out as described previously (Chassot et
740 al., 2008a). Anti-POU5F1 antibody and protein A/G magnetic beads (cat 88802, Thermo
741 Scientific) were incubated with protein extracts overnight at 4°C. Then magnetic beads were
742 isolated against gravity and washed three times in Phosphate Buffered Saline.
743 Immunoprecipitated proteins were denatured in an equal volume of 2x Laemmli's buffer,
744 separated on a 10% polyacrylamide SDS page gel, blotted on Immobilon-E PVDF transfer
745 membranes (IEVH85R, Merck) and incubated with the primary antibodies. Horseradish
746 peroxidase-conjugated secondary antibodies were used for chemiluminescent detection (cat
747 PI-1000 and PI-2000, Vector).

748

749

750 **REFERENCES**

751

752 Adams, I.R., and McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial
753 germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129, 1155-1164.

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

757 Anton, R., Kestler, H.A., and Kuhl, M. (2007). Beta-catenin signaling contributes to stemness
758 and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Lett* 581, 5247-5254.

759 Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M.A., Polo, J.M., Bronson, R., Sengupta, S., Seandel, M.,
760 Geijsen, N., and Hochedlinger, K. (2011). Sox2(+) adult stem and progenitor cells are
761 important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell stem cell* 9, 317-329.

762 Atlasi, Y., Looijenga, L., and Fodde, R. (2014). Cancer stem cells, pluripotency, and cellular
763 heterogeneity: a WNTer perspective. *Curr Top Dev Biol* 107, 373-404.

764 Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T.,
765 and Adjaye, J. (2007). Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-
766 renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 500-510.

767 Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur,
768 J.S., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further
769 update. *Biochem J* 408, 297-315.

770 Barrell, W.B., Szabo-Rogers, H.L., and Liu, K.J. (2012). Novel reporter alleles of GSK-3alpha
771 and GSK-3beta. *PLoS One* 7, e50422.

772 Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D.H., McMahon, A.P., Sommer, L.,
773 Boussadia, O., and Kemler, R. (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-
774 mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial
775 development. *Development* 128, 1253-1264.

776 Chassot, A.A., Bradford, S.T., Auguste, A., Gregoire, E.P., Pailhoux, E., de Rooij, D.G., Schedl,
777 A., and Chaboissier, M.C. (2012). WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation
778 in the early mouse gonad. *Development* 139, 4461-4472.

779 Chassot, A.A., Gregoire, E.P., Lavery, R., Taketo, M.M., de Rooij, D.G., Adams, I.R., and
780 Chaboissier, M.C. (2011). RSPO1/beta-catenin signaling pathway regulates oogenesis
781 differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 6, e25641.

782 Chassot, A.A., Le Rolle, M., Jourden, M., Taketo, M.M., Ghyselinck, N.B., and Chaboissier,
783 M.C. (2017). Constitutive WNT/CTNNB1 activation triggers spermatogonial stem cell
784 proliferation and germ cell depletion. *Dev Biol* 426, 17-27.

785 Chassot, A.A., Lossaint, G., Turchi, L., Meneguzzi, G., Fisher, D., Ponzio, G., and Dulic, V.
786 (2008a). Confluence-induced cell cycle exit involves pre-mitotic CDK inhibition by p27(Kip1)
787 and cyclin D1 downregulation. *Cell Cycle* 7, 2038-2046.

788 Chassot, A.A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G.,
789 de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.C. (2008b). Activation of beta-catenin signaling
790 by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 17, 1264-1277.

791 De Cian, M.C., Pauper, E., Bandiera, R., Vidal, V.P., Sacco, S., Gregoire, E.P., Chassot, A.A.,
792 Panzolini, C., Wilhelm, D., Pailhoux, E., *et al.* (2016). Amplification of R-spondin1 signaling
793 induces granulosa cell fate defects and cancers in mouse adult ovary. *Oncogene*.

794 De Cian, M.C., Pauper, E., Bandiera, R., Vidal, V.P., Sacco, S., Gregoire, E.P., Chassot, A.A.,
795 Panzolini, C., Wilhelm, D., Pailhoux, E., *et al.* (2017). Amplification of R-spondin1 signaling
796 induces granulosa cell fate defects and cancers in mouse adult ovary. *Oncogene* 36, 208-218.

797 Di Carlo, A., and De Felici, M. (2000). A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell
798 development. *Dev Biol* 226, 209-219.

799 Fabre, L., Zhang, J., Guigon, G., Le Hello, S., Guibert, V., Accou-Demartin, M., de Romans,
800 S., Lim, C., Roux, C., Passet, V., *et al.* (2012). CRISPR typing and subtyping for improved
801 laboratory surveillance of Salmonella infections. *PLoS One* 7, e36995.

802 Faunes, F., Hayward, P., Descalzo, S.M., Chatterjee, S.S., Balayo, T., Trott, J., Christoforou,
803 A., Ferrer-Vaquer, A., Hadjantonakis, A.K., Dasgupta, R., *et al.* (2013). A membrane-
804 associated beta-catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse
805 embryonic stem cells. *Development* 140, 1171-1183.

806 Gallardo, T., Shirley, L., John, G.B., and Castrillon, D.H. (2007). Generation of a germ cell-
807 specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre. *Genesis* 45, 413-417.

808 Gill, M.E., Hu, Y.C., Lin, Y., and Page, D.C. (2011). Licensing of gametogenesis, dependent
809 on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proc*
810 *Natl Acad Sci U S A* 108, 7443-7448.

811 Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M.M.
812 (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene.
813 *Embo J* 18, 5931-5942.

814 Harris, A., Siggers, P., Corrochano, S., Warr, N., Sagar, D., Grimes, D.T., Suzuki, M., Burdine,
815 R.D., Cong, F., Koo, B.K., *et al.* (2018). ZNR3 functions in mammalian sex determination by
816 inhibiting canonical WNT signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 5474-5479.

817 Hayashi, K., de Sousa Lopes, S.M., and Surani, M.A. (2007). Germ cell specification in mice.
818 *Science* 316, 394-396.

819 Heuberger, J., and Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and
820 canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002915.

821 Honecker, F., Kersemaekers, A.M., Molier, M., Van Weeren, P.C., Stoop, H., De Krijger, R.R.,
822 Wolffenbuttel, K.P., Oosterhuis, W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L.H. (2004). Involvement
823 of E-cadherin and beta-catenin in germ cell tumours and in normal male fetal germ cell
824 development. *J Pathol* 204, 167-174.

825 Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J.,
826 Holcombe, R.F., and Waterman, M.L. (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid
827 enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* 28, 53-57.

828 Jameson, S.A., Natarajan, A., Cool, J., DeFalco, T., Maatouk, D.M., Mork, L., Munger, S.C.,
829 and Capel, B. (2012). Temporal transcriptional profiling of somatic and germ cells reveals
830 biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse gonad. *PLoS Genet* 8, e1002575.

831 Kelly, K.F., Ng, D.Y., Jayakumar, G., Wood, G.A., Koide, H., and Doble, B.W. (2011). beta-
832 catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent
833 mechanism. *Cell stem cell* 8, 214-227.

834 Kerr, C.L., Hill, C.M., Blumenthal, P.D., and Gearhart, J.D. (2008). Expression of pluripotent
835 stem cell markers in the human fetal ovary. *Human reproduction* 23, 589-599.

836 Koo, B.K., Spit, M., Jordens, I., Low, T.Y., Stange, D.E., van de Wetering, M., van Es, J.H.,
837 Mohammed, S., Heck, A.J., Maurice, M.M., *et al.* (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-
838 cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488, 665-669.

839 Lesch, B.J., and Page, D.C. (2012). Genetics of germ cell development. *Nat Rev Genet* 13,
840 781-794.

841 Levasseur, D.N., Wang, J., Dorschner, M.O., Stamatoyannopoulos, J.A., and Orkin, S.H.
842 (2008). Oct4 dependence of chromatin structure within the extended Nanog locus in ES cells.
843 *Genes Dev* 22, 575-580.

844 Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T.J., and
845 Palecek, S.P. (2013). Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells
846 by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 8, 162-
847 175.

848 Liu, C.F., Bingham, N., Parker, K., and Yao, H.H. (2009). Sex-specific roles of beta-catenin in
849 mouse gonadal development. *Hum Mol Genet* 18, 405-417.

850 Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M.,
851 Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., *et al.* (2002). Negative feedback loop of Wnt
852 signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and*
853 *cellular biology* 22, 1184-1193.

854 Maatouk, D.M., Kellam, L.D., Mann, M.R., Lei, H., Li, E., Bartolomei, M.S., and Resnick, J.L.
855 (2006). DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ
856 cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development* 133, 3411-3418.

857 Maatouk, D.M., Mork, L., Chassot, A.A., Chaboissier, M.C., and Capel, B. (2013). Disruption
858 of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa
859 cells in the perinatal Wnt4 mutant ovary. *Dev Biol* 383, 295-306.

860 Manuylov, N.L., Smagulova, F.O., Leach, L., and Tevosian, S.G. (2008). Ovarian development
861 in mice requires the GATA4-FOG2 transcription complex. *Development* 135, 3731-3743.

862 McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262, 1-15.

863 Mikedis, M.M., and Downs, K.M. (2014). Mouse primordial germ cells: a reappraisal.
864 *International review of cell and molecular biology* 309, 1-57.

865 Miles, D.C., and Western, P.S. (2012). Germ cell sex and cell cycle. *Histol Histopathol* 27, 445-
866 457.

867 Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-
868 fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593-605.

869 Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H.J. (2019). Human germ cell tumours from a
870 developmental perspective. *Nat Rev Cancer* 19, 522-537.

871 Peifer, M., and Polakis, P. (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look
872 outside the nucleus. *Science* 287, 1606-1609.

873 Saitou, M., and Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect*
874 *Biol* 4.

875 Seligman, J., and Page, D.C. (1998). The Dazh gene is expressed in male and female
876 embryonic gonads before germ cell sex differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 245,
877 878-882.

878 Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W.,
879 Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-
880 determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*
881 346, 240-244.

882 Souquet, B., Tourpin, S., Messiaen, S., Moison, D., Habert, R., and Livera, G. (2012). Nodal
883 signaling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. *Endocrinology* 153, 2466-2473.

884 Spiller, C.M., Feng, C.W., Jackson, A., Gillis, A.J., Rolland, A.D., Looijenga, L.H., Koopman,
885 P., and Bowles, J. (2012). Endogenous Nodal signaling regulates germ cell potency during
886 mammalian testis development. *Development* 139, 4123-4132.

887 Takase, H.M., and Nusse, R. (2016). Paracrine Wnt/beta-catenin signaling mediates
888 proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis. *Proc Natl Acad Sci U*
889 *S A*.

890 ten Berge, D., Kurek, D., Blauwkamp, T., Koole, W., Maas, A., Eroglu, E., Siu, R.K., and Nusse,
891 R. (2011). Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem
892 cells. *Nat Cell Biol* 13, 1070-1075.

893 Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., and McMahon, A.P. (1999). Female development
894 in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397, 405-409.

895 van Amerongen, R., Bowman, A.N., and Nusse, R. (2012). Developmental stage and time
896 dictate the fate of Wnt/beta-catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell stem*
897 *cell* *11*, 387-400.

898 Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C.Y., and Nusse, R. (2015). Self-renewing diploid
899 Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* *524*, 180-185.

900 Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.T., Ma, X.J.,
901 and Luo, Y. (2012). RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed,
902 paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* *14*, 22-29.

903 Wray, J., and Hartmann, C. (2012). WNTing embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* *22*, 159-
904 168.

905 Wu, D., and Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem*
906 *Sci* *35*, 161-168.

907 Wu, Q., Fukuda, K., Kato, Y., Zhou, Z., Deng, C.X., and Saga, Y. (2016). Sexual Fate Change
908 of XX Germ Cells Caused by the Deletion of SMAD4 and STRA8 Independent of Somatic Sex
909 Reprogramming. *PLoS Biol* *14*, e1002553.

910 Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and
911 Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519-523.

912

Fig1

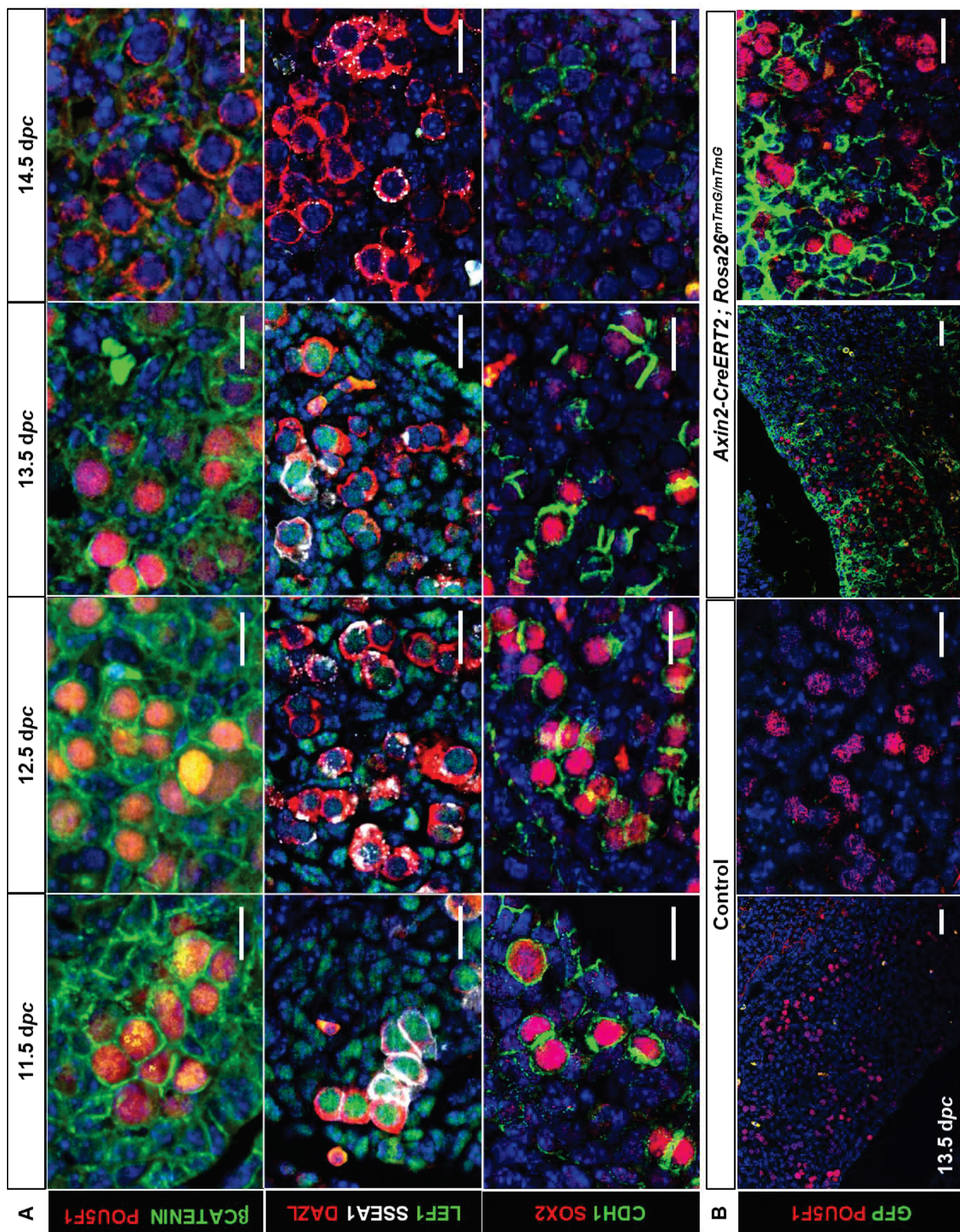
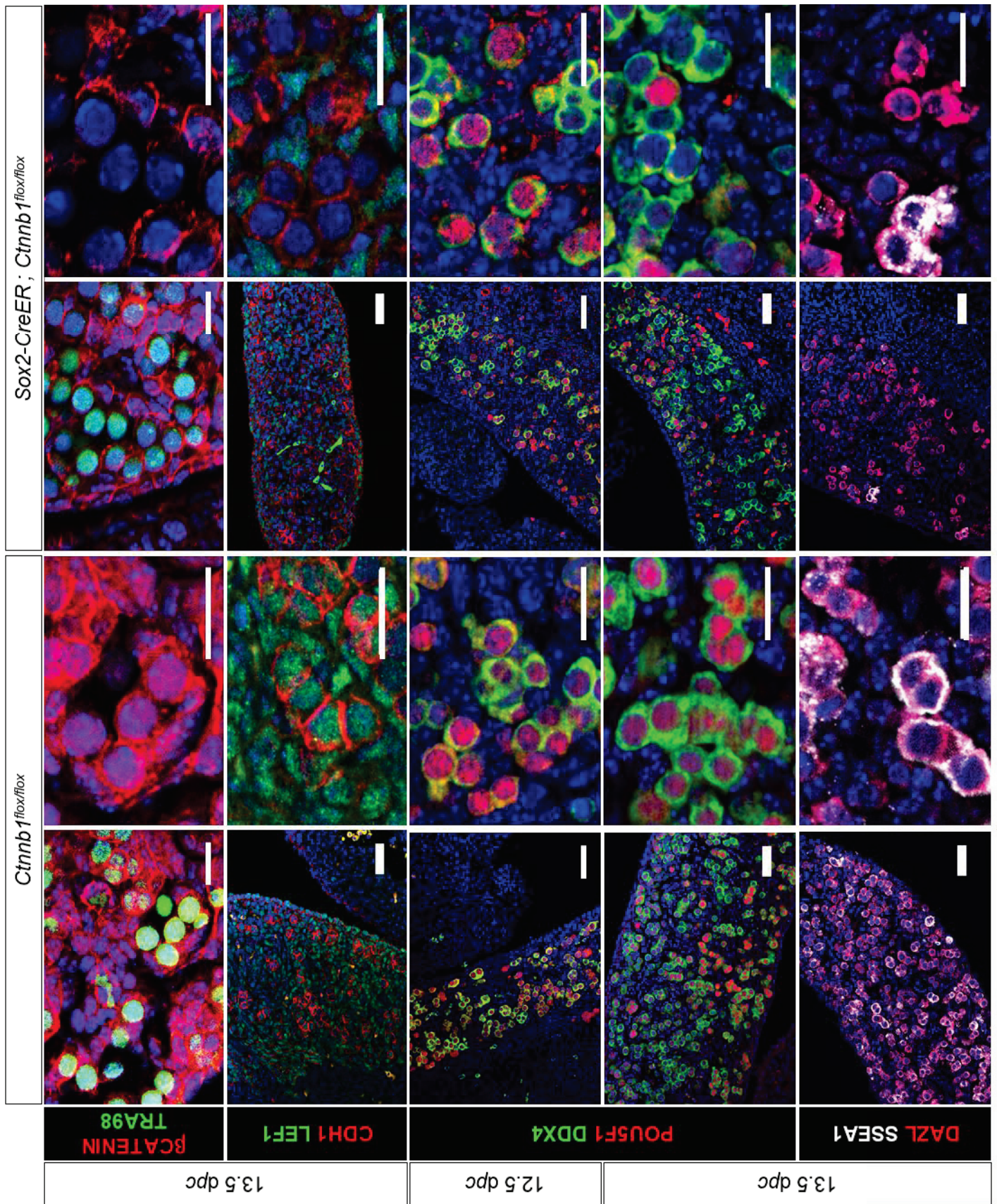


Fig2



A.

B.

Fig 3

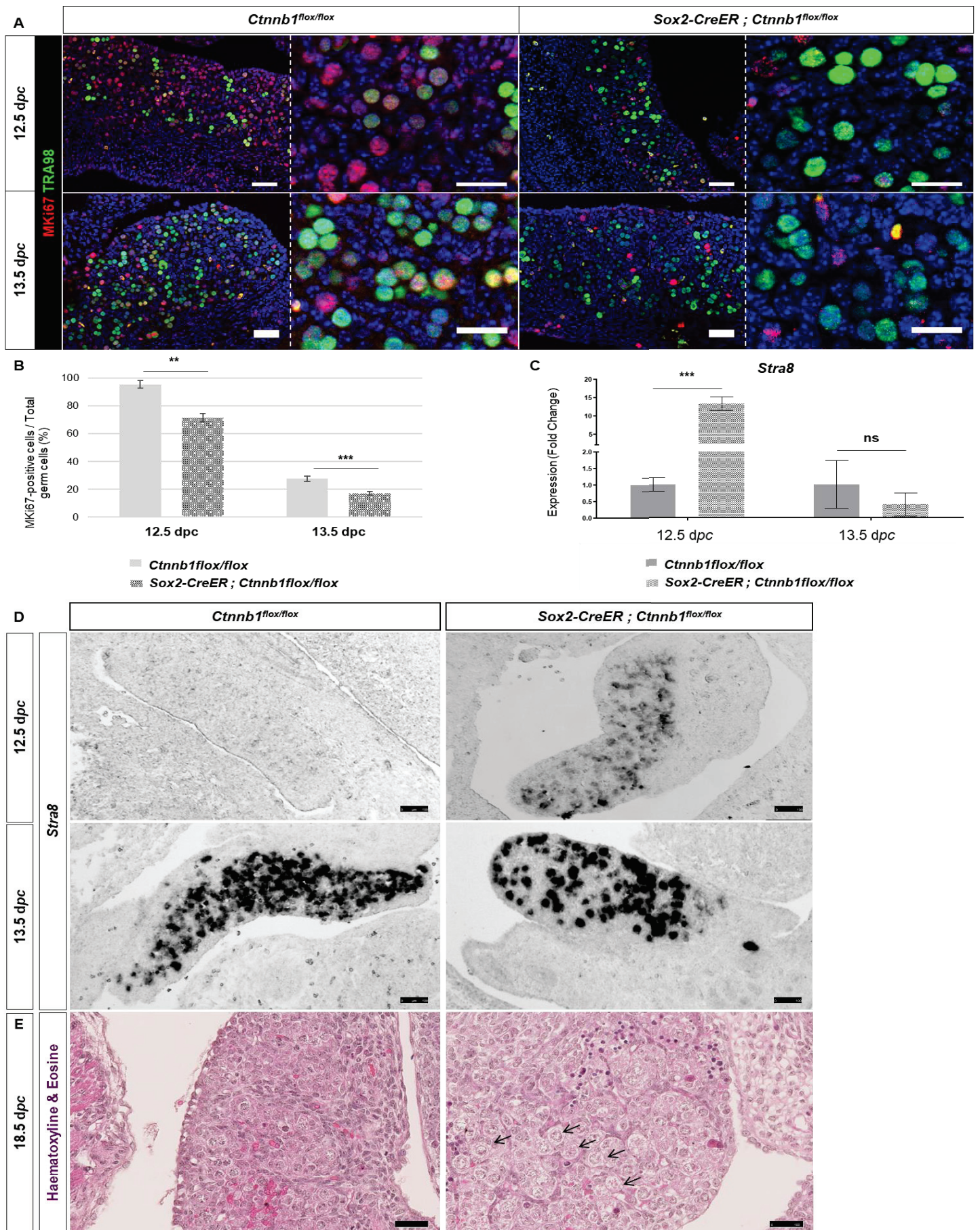


Fig 4

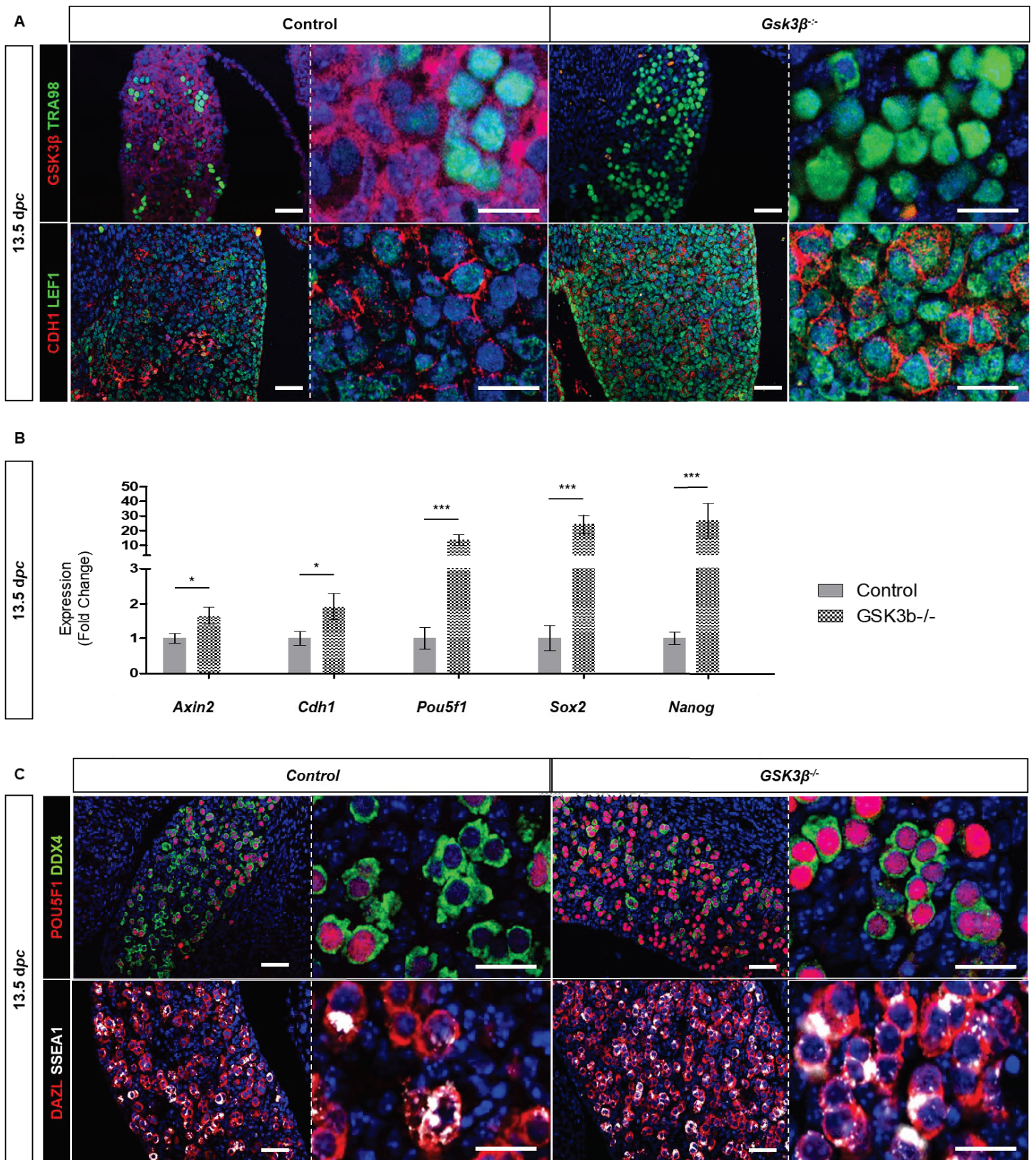


Fig 5

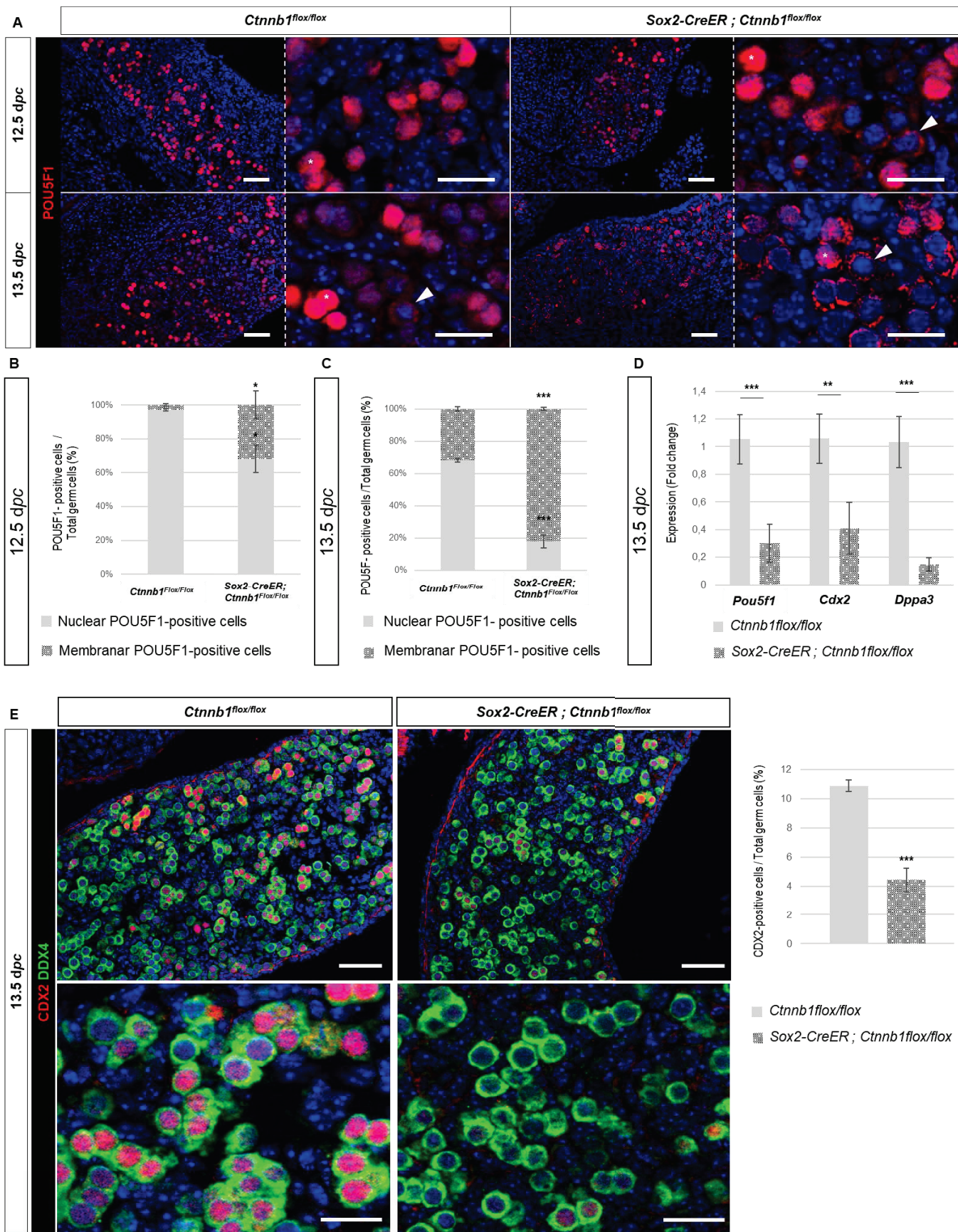


Fig 6

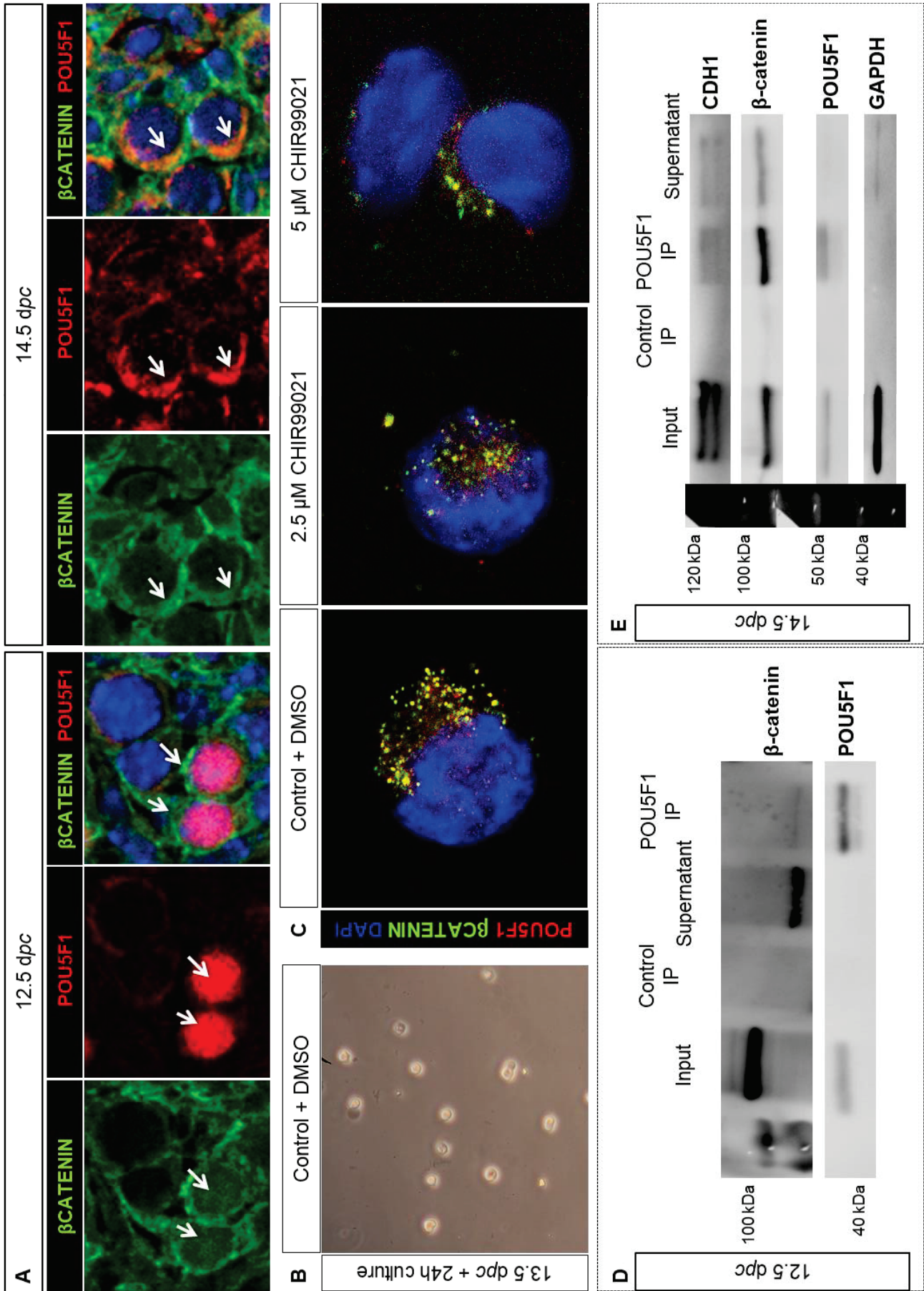
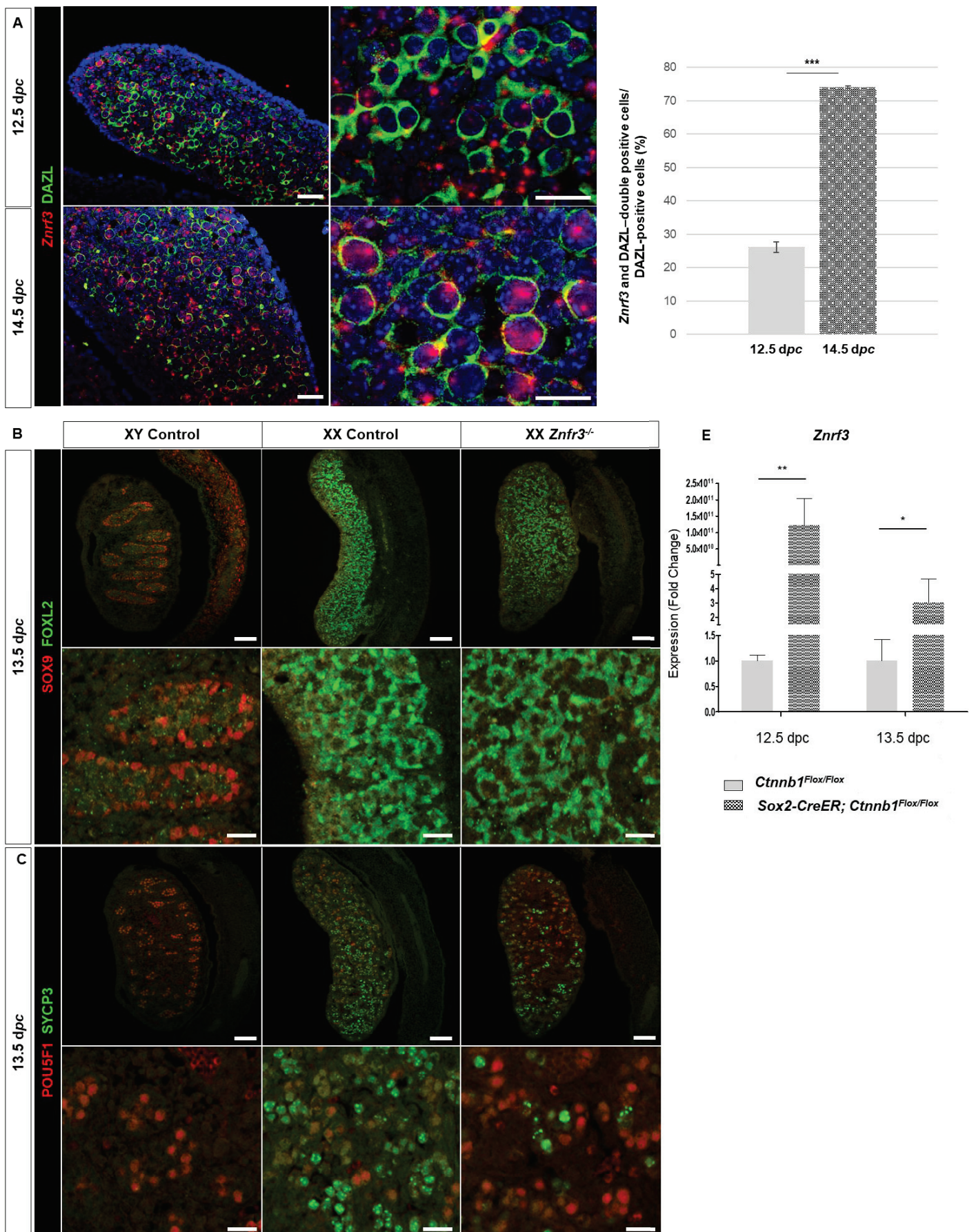
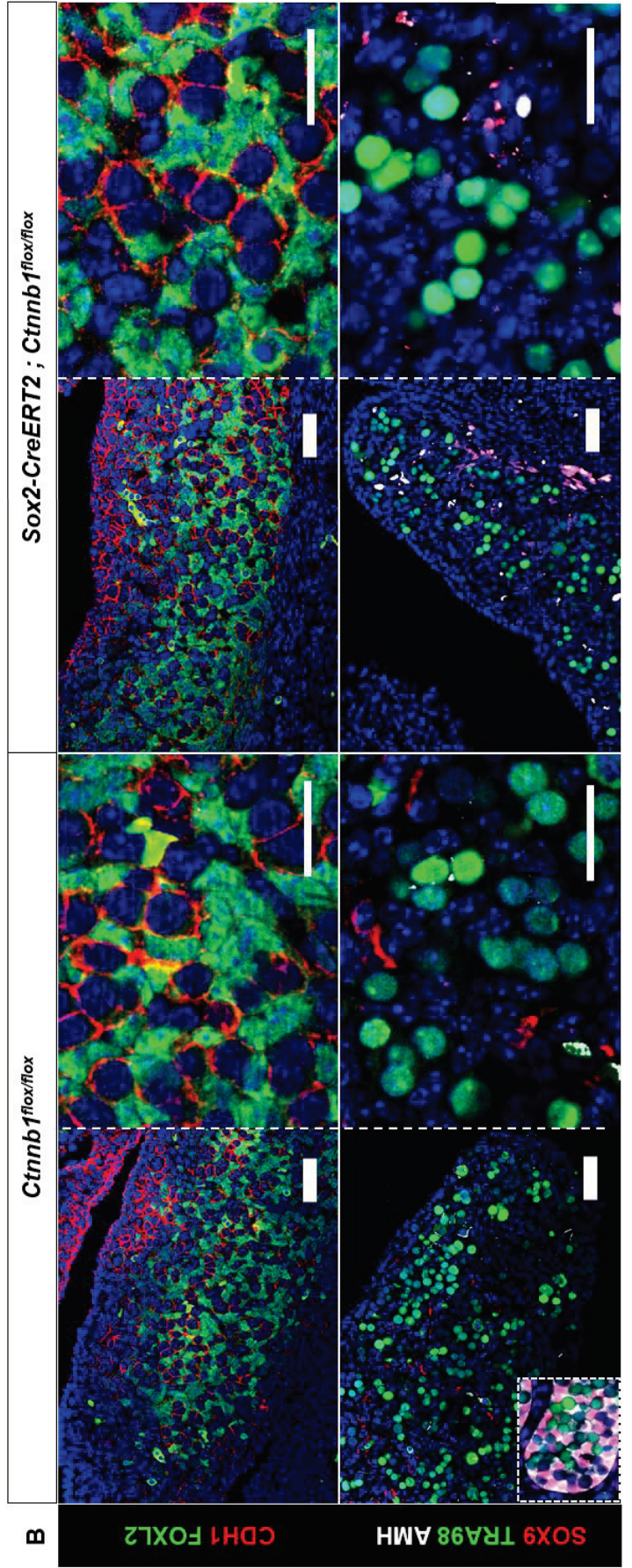
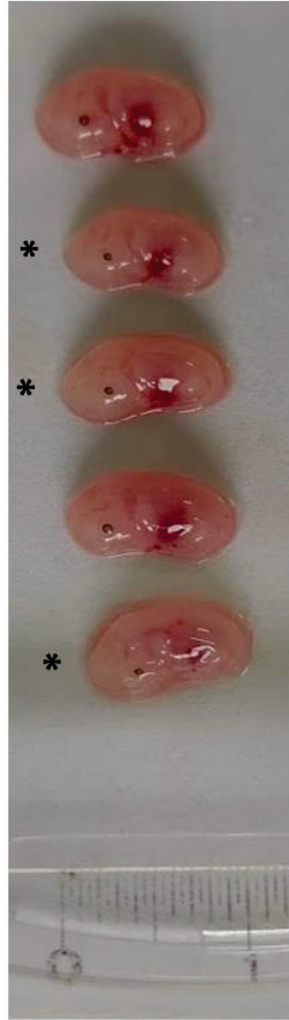
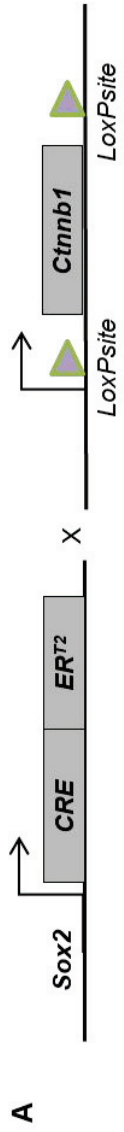
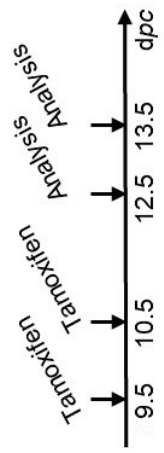


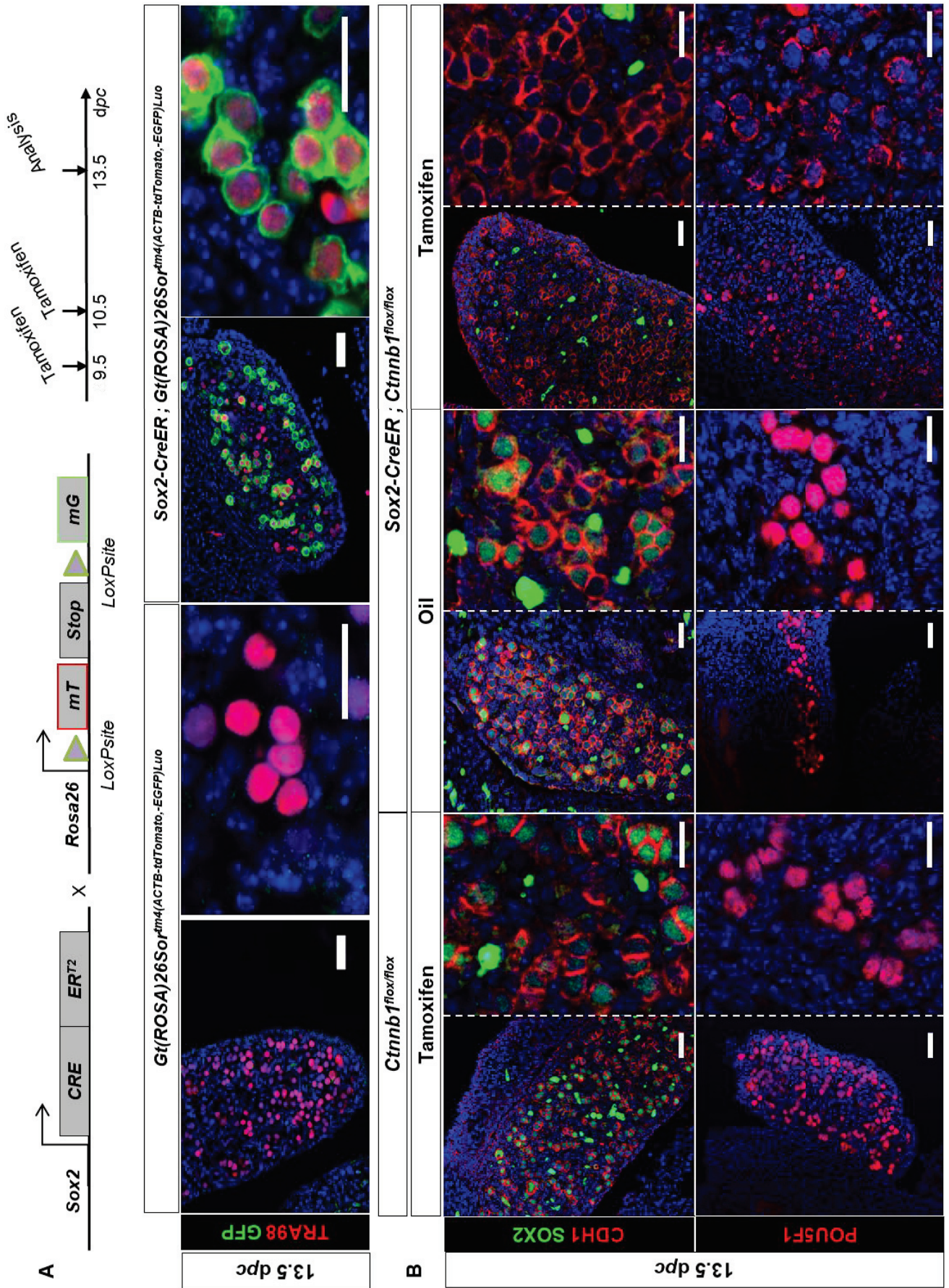
Fig 7



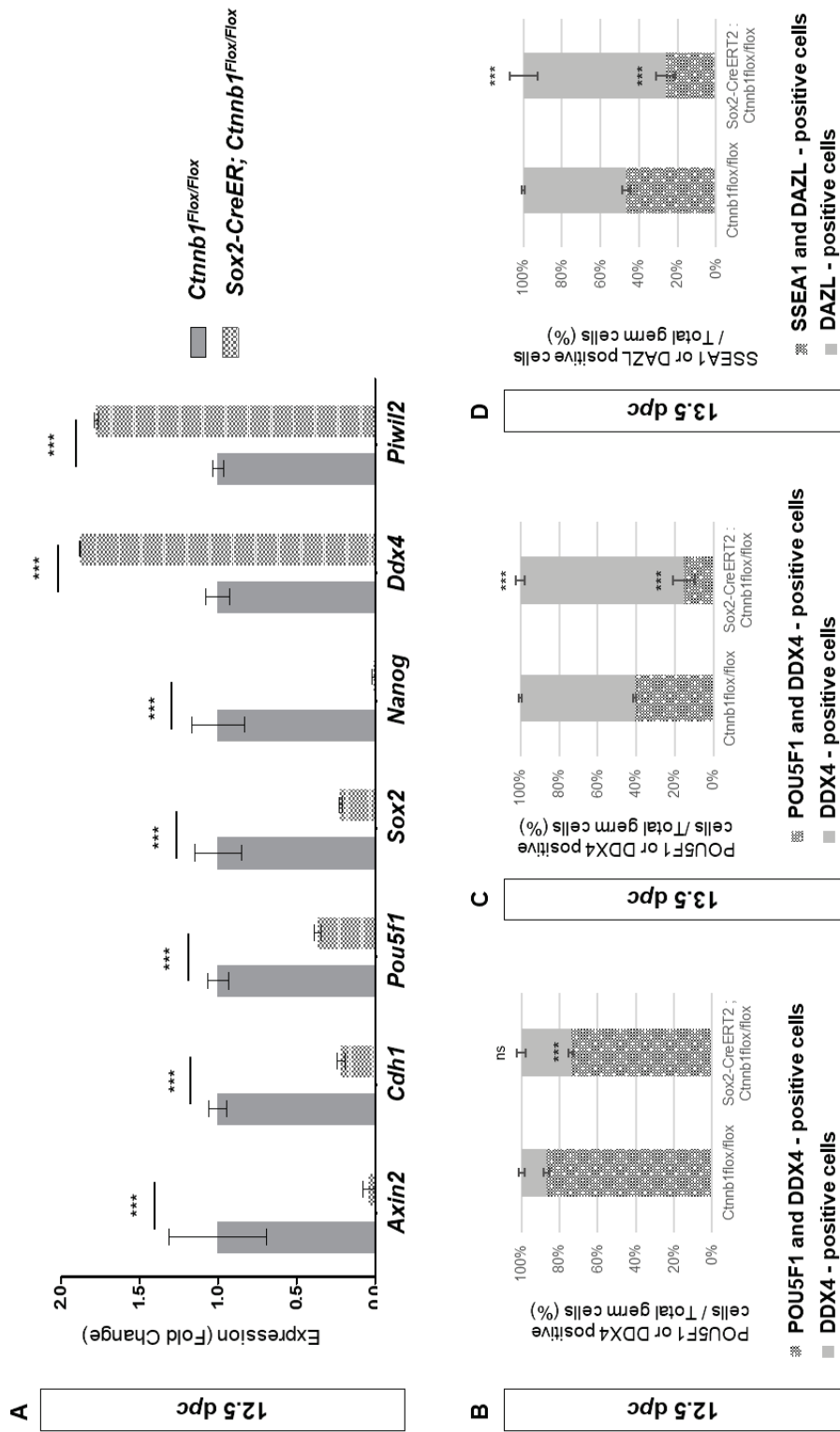
Sup. Fig 2



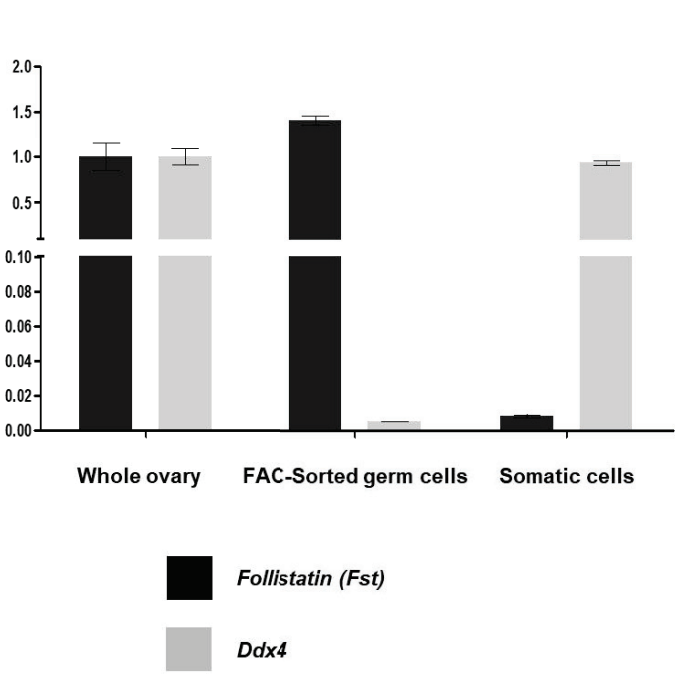
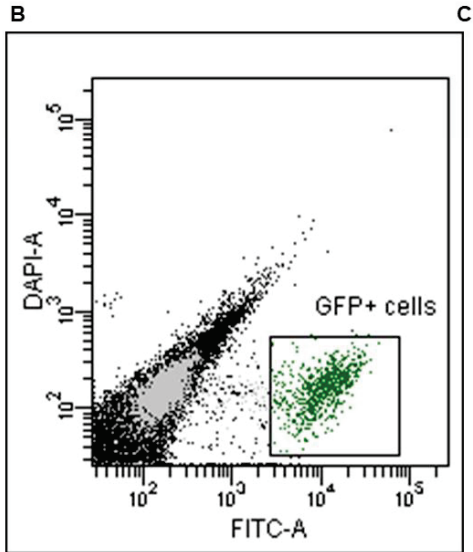
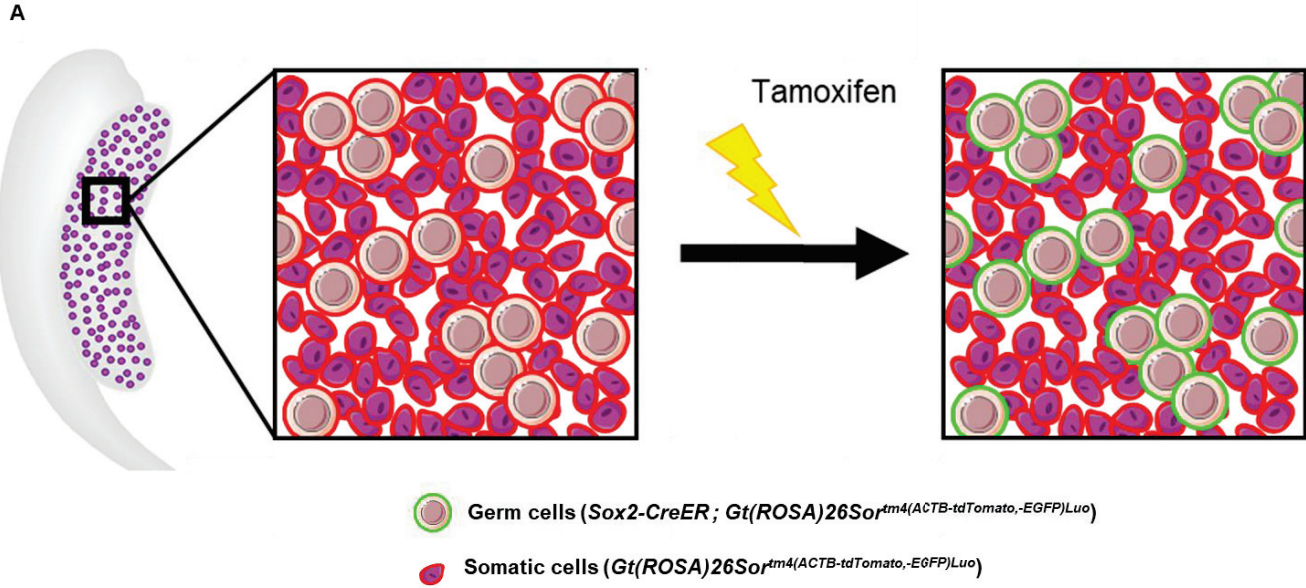
Sup. Fig 3



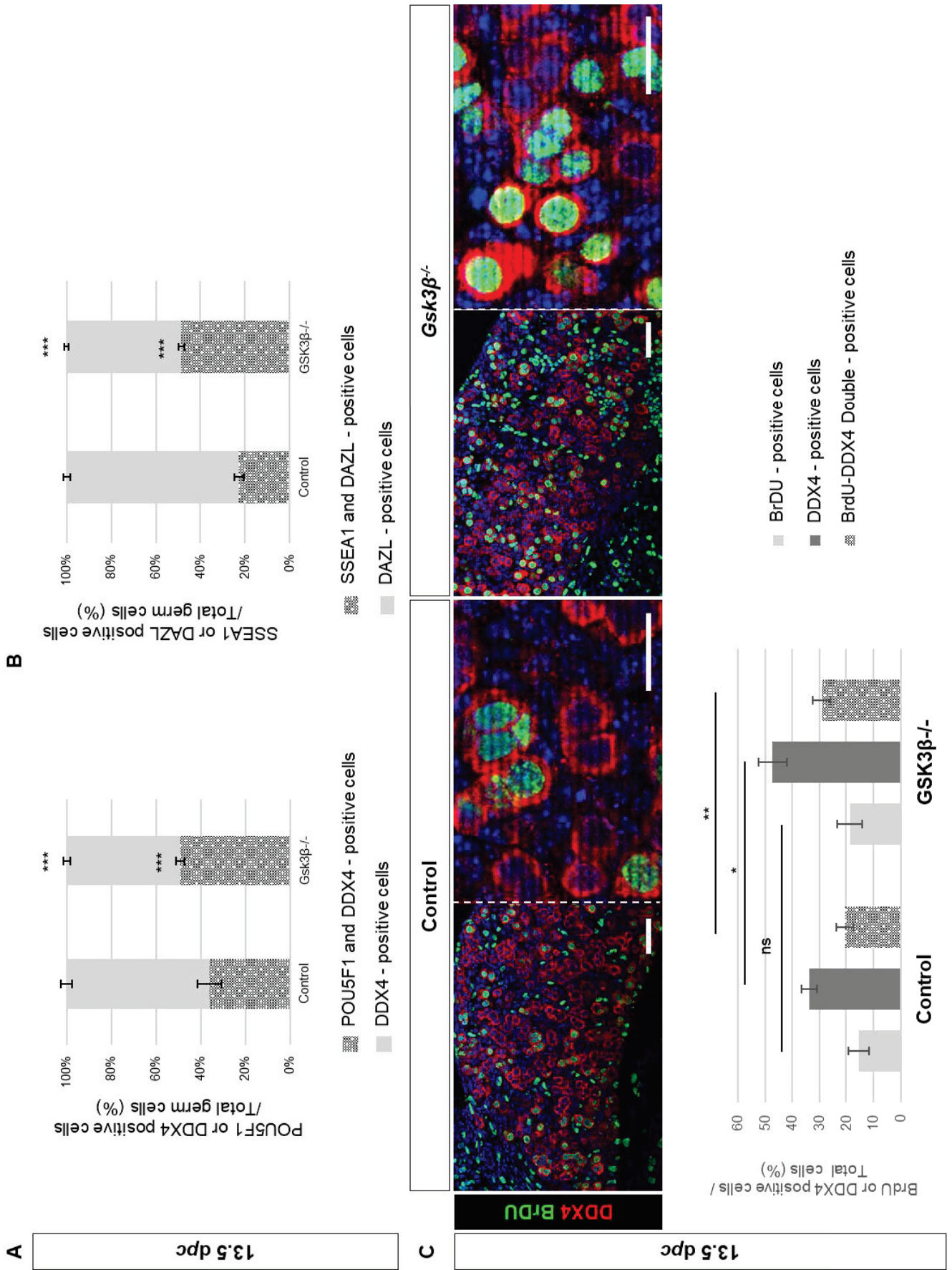
Sup. Fig 4



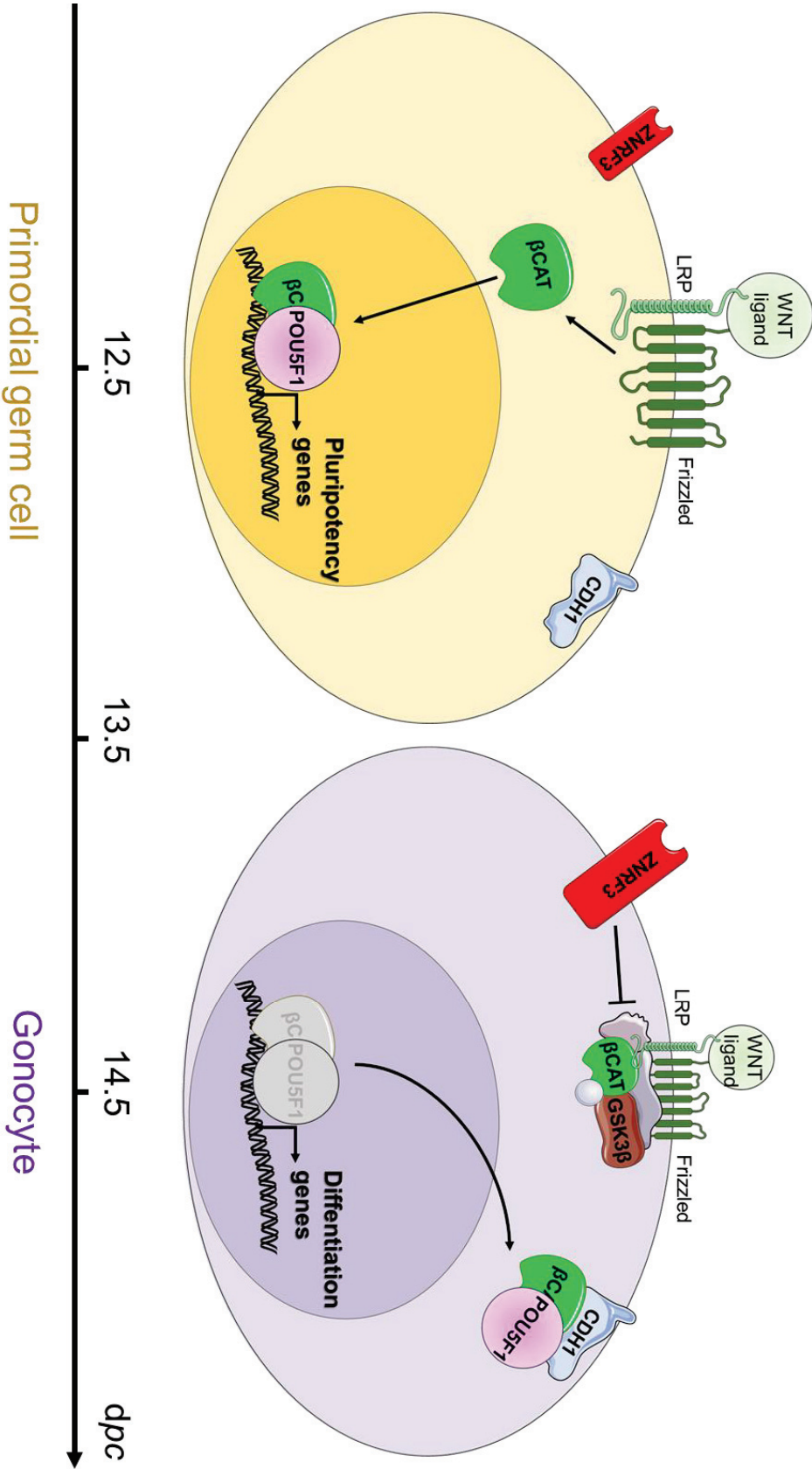
Sup. Fig 5



Sup. Fig 6



Sup. Fig 7



Discussion générale et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a été d'éclaircir le rôle spécifique de la voie WNT/ β -catenin au cours du développement ovarien et plus particulièrement l'implication de la protéine β -catenin au cours de la différenciation des cellules germinales femelles.

La voie WNT/ β -catenin est une voie de signalisation que l'on retrouve dans de nombreux processus biologiques embryonnaires et adultes. La moindre dérégulation de cette voie implique des complications biologiques induisant des pathologies génétiques et des cancers.

Le nombre important d'acteurs de cette voie rend son étude très compliquée. L'essor de la génétique et des techniques de biologie moléculaire a permis de cibler spécifiquement l'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation WNT/ β -catenin.

Ainsi au cours des 15 dernières années, différentes études ont pu mettre en évidence l'implication de cette voie de signalisation au cours de la différenciation ovarienne.

La gonade est le seul organe qui possède un potentiel de différenciation sexuellement dimorphique. Les gonades sont composées de deux types cellulaires majeurs, les cellules somatiques et les cellules germinales. Ces deux types cellulaires possèdent également cette capacité bipotentielle. De plus, les cellules germinales sont les seules cellules capables de réaliser la méiose afin de perpétuer l'espèce par la reproduction sexuée. La lignée germinale demande une longue mise en place puisqu'elle commence au cours de la vie fœtale et se poursuit à l'âge adulte afin de fournir des gamètes matures et fertiles. Le développement des cellules germinales nécessite de multiples événements rigoureusement contrôlés (spécification, prolifération, migration, reprogrammation épigénétique, engagement sexuel, méiose). Ces différents événements peuvent être la cible de dérégulations ou de perturbations ayant des conséquences drastiques sur la fertilité de l'individu à l'âge adulte, pouvant également provoquer l'apparition de cancers.

Les cellules germinales sont de plus des cellules souches pluripotentes qui ont la capacité de se différencier et donner à terme tous les tissus de l'organisme. Cette plasticité est uniquement retrouvée au sein des cellules souches embryonnaires, desquelles les cellules germinales sont très proches du point de vue de leur expression génique.

Au cours de ces travaux, nous avons donc cherché à comprendre comment la voie WNT/ β -catenin était impliquée dans la régulation de la différenciation des cellules germinales *in vivo*. La compréhension des mécanismes fondamentaux nous permet i) à court terme de progresser dans nos connaissances sur le développement des cellules germinales dans un contexte physiologique, ii) à moyen terme d'étendre les

mécanismes moléculaires des cellules germinales aux cellules souches, intéressant ainsi une large partie de la communauté scientifique et iii) à long terme d'envisager de réparer ou d'anticiper des défauts du développement à l'origine de troubles de la fertilité et de cancers.

Ablation génétique de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques WT1-positives

Des études précédentes ont montré que la protéine RSPO1 active la voie de signalisation WNT/ β -catenin canonique qui est nécessaire au développement de l'ovaire (voir pour revue (Chassot, Gillot, et Chaboissier 2014)).

Dans la première partie de mes travaux de thèse, nous avons montré que l'ablation de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques (*WT1-CreERT2* ; *Ctnnb1*^{Flox/Flox}) récapitule le phénotype du mutant *Rspo1*^{-/-} en induisant la vascularisation de la gonade XX et l'inhibition de l'entrée en méiose des cellules germinales. En effet, les cellules germinales, en l'absence d'activité WNT/ β -catenin dans leur environnement somatique (souris *WT1-CreERT2* ; *Ctnnb1*^{Flox/Flox}), conservent leurs propriétés pluripotentes et n'entrent pas en méiose. De plus, dans ce modèle murin, le maintien de la prolifération des cellules germinales indique que ces cellules régulent leur propre cycle cellulaire par des facteurs encore inconnus.

Il est maintenant nécessaire d'approfondir l'étude de ce modèle en utilisant des marqueurs des cellules germinales mâles spécifiques de la quiescence (tels que *Nanos2*) afin de déterminer si les cellules germinales se sont orientées vers une différenciation de type mâle, comme c'est le cas dans les mutants XX *Rspo1*^{-/-}, ou si leur différenciation est affectée sans pour autant présenter d'inversion de sexe.

Des travaux non publiés du laboratoire indiquent que la fenêtre d'action de *Rspo1* se situe entre 10.5 et 11.5 *jpc* (Tang et al, en préparation), soit bien plus tôt que ce qui était initialement admis. Dans le cas où l'absence de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules somatiques induirait une inversion de sexe des cellules germinales, on peut supposer que *Rspo1* est nécessaire à l'engagement des cellules germinales dans la voie femelle. En effet, ce phénotype ne se retrouve pas dans le modèle *SFI-Cre* ; *Ctnnb1*^{Flox/Flox} (C.-F. Liu et al. 2008; Manuylov et al. 2008; Chassot et al. 2011), dans lequel la CRE n'est active qu'à partir de 11.5 *jpc*.

Dans le cas où, en l'absence de *Ctnnb1* dans les cellules somatiques, les cellules germinales présenteraient un défaut de différenciation sans inversion de sexe, on peut supposer que la voie WNT/ β -catenin somatique induit un signal paracrine qui va initier la différenciation des cellules germinales XX et leur permettre d'entrer en méiose.

Ces résultats indiqueraient donc que l'engagement sexuel des cellules germinales ne dépendrait pas de la voie WNT/ β -catenin mais de facteurs encore inconnus. Dans ce cas, un séquençage à haut débit du transcriptome des gonades *WT1-CreERT2* ; *Ctnnb1*^{Flox/Flox} permettra de mettre en évidence des gènes

candidats, qui seront sélectionnés sur leur expression différentielle entre gonades contrôles et mutantes et sur le fait qu'ils codent pour des facteurs sécrétés capables d'interagir avec des récepteurs exprimés sur les cellules germinales (WNTs, FGFs... par exemple).

L'ablation pharmacologique des cellules germinales (Guigon et Magre 2006; Maatouk et al. 2008; 2012) induit un sauvetage de l'inversion de sexe somatique due à la perte de fonction de *Rspo1* ou *Wnt4*. Ces résultats illustrent l'importance de la communication entre l'environnement somatique et les cellules germinales, permettant la différenciation sexuelle des cellules germinales et leur entrée en méiose (Adams et McLaren 2002; Kocer et al. 2009).

La protéine RSPO1, sécrétée par les cellules somatiques, semble être un bon candidat pour induire la voie WNT/ β -catenin dans les cellules germinales et participer à leur différenciation en cellules compétentes pour la gamétogenèse. En retour, les gonocytes méiotiques acquièrent la capacité d'induire des signaux qui maintiennent la différenciation sexuelle somatique femelle avant la naissance, synchronisant ainsi la différenciation somatique et germinale dans la gonade.

Ces observations corroborent la conclusion selon laquelle l'épuisement des cellules germinales aux stades pré-méiotiques ne conduit pas à une inversion du sexe tandis que l'épuisement des cellules germinales méiotiques conduit à une inversion de sexe (voir pour revue (Guigon et Magre 2006).

Le modèle murin *Kit*^{W^v/W^v} est un modèle perte de fonction pour le gène *Kit* (Bernex et al. 1996). *Kit* est nécessaire à la migration des cellules germinales primordiales jusqu'à la crête génitale (Mahakali Zama, Hudson, et Bedell 2005). L'ablation de ce gène entraîne, entre autres conséquences, le développement de gonades dépourvues de cellules germinales aux alentours de 9.5 *jpc* (Bernex et al. 1996). Dans les souris XX *Kit*^{W^v/W^v}, l'absence des cellules germinales pré-méiotiques confirme la conclusion selon laquelle une perte de cellules germinales à ce stade précoce ne modifie pas le destin des cellules somatiques dans l'ovaire fœtal. Cependant, il est possible que les cellules de la granulosa acquièrent la compétence pour la transdifférenciation après un contact avec des cellules germinales méiotiques. Si les cellules germinales sont perdues avant l'entrée de la méiose, les cellules pré-granulosa ne passent pas par cette étape de différenciation et ne peuvent pas se transdifférencier en cellules de type Sertoli. Cela impliquerait que les interactions cellules pré-granulosa-cellules germinales, qui sont essentielles après la naissance pour la folliculogenèse, jouent également un rôle pendant les stades ovariens fœtaux (Bernex et al. 1996; Guigon et Magre 2006; Maatouk et al. 2012). La génération d'un double mutant *Rspo1*^{-/-}; *Kit*^{W^v/W^v}, que j'ai initiée pendant ma thèse, nous permettra de déterminer si les cellules germinales induisent l'inversion de sexe des cellules somatiques dans le mutant *Rspo1*^{-/-} dans des conditions physiologiques, sans agent pharmacologique.

Les résultats préliminaires que j'ai obtenus suggèrent que les cellules SOX9-positives qui apparaissent vers 18.5 dans la gonade *Rspo1*^{-/-} ne sont pas présentes dans les gonades *Rspo1*^{-/-}; *Kit*^{W^v/W^v}, confirmant les travaux publiés par (Maatouk et al. 2012).

Ainsi nous pouvons supposer que l'engagement sexuel des cellules germinales XX est nécessaire au maintien de la différenciation des cellules somatiques XX. Si les cellules germinales s'engagent dans un destin mâle dans un environnement XX, elles vont sécréter des signaux afin d'induire une transdifférenciation de leur environnement.

Différenciation des cellules germinales, acide rétinoïque et activité WNT/ β -catenin

La notion que les cellules germinales n'initient pas la méiose en raison d'une propriété autonome intrinsèque mais plutôt sous l'influence d'une molécule de signalisation produite par les cellules ovariennes somatiques, a conduit à la recherche d'une «substance induisant la méiose» (MIS) (Bowles et al. 2006; E. Evans et al. 2014). L'ATRA (All-Trans Retinoic Acid) a été suggéré comme étant ce MIS mais son rôle dans ce processus biologique a été remis en question récemment, ce qui a donné lieu à des rapports contradictoires. Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'étude du phénotype des souris porteuses de délétions génétiques des trois *Aldh1a1-3* (Chassot et al., 2019, en révision, Annexe 2) afin de discriminer le rôle de l'ATRA en tant que MIS. Il n'a été observé qu'une légère diminution de l'expression de *Stra8*, et cette réduction n'était pas suffisamment robuste pour empêcher l'initiation de la méiose et la progression des cellules germinales dans la prophase I méiotique.

Ainsi, la signalisation de l'ATRA n'initie pas mais contribue à la méiose. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Vernet et al. (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/716498v1>, également en révision auprès du même journal), qui décrit un retard similaire dans l'expression de *Stra8* et une progression normale de la méiose dans les ovaires fœtaux de souris dépourvues des récepteurs RARA, RARB et RARG de l'ATRA (Vernet et al. 2019). Pris ensemble, nos résultats et ceux de Vernet et al. indiquent que la signalisation ATRA est clairement inutile pour l'entrée de la méiose. Différentes études décrivent que d'autres voies comme la signalisation des TGF β /SMAD, le complexe Répresseur Polycomb *PRCI*, *Msx* et WNT/ β -catenin, participent à l'initiation de la méiose (Chassot et al. 2011; Le Bouffant et al. 2011; Yokobayashi et al. 2013; Miyauchi et al. 2017).

Globalement, ces études indiquent que des voies convergentes autres que la signalisation ATRA collaborent pour réguler l'expression de *Stra8* et la transition de la mitose au cycle de la méiose.

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons voulu comprendre le rôle de la protéine β -catenin spécifiquement dans les cellules germinales.

L'étude de la délétion génétique spécifique de *Ctnnb1* (*Sox2-CreERT2* ; *Ctnnb1*^{Flox/Flox}) dans les cellules germinales a montré que la protéine β -catenin est impliquée dans la différenciation des cellules germinales au cours du "licensing" de celles-ci. En effet, dès 12.5 *jpc* l'état de pluripotence des

cellules germinales primordiales est perturbé dans ces mutants. La différenciation précoce des cellules germinales en gonocytes induit un arrêt de la prolifération et une entrée en méiose précoce à 12.5 *jpc*. Ainsi la protéine β -catenin est nécessaire au maintien de l'état de pluripotence des cellules germinales primordiales jusqu'à ce qu'un signal provenant de l'environnement induise l'entrée en méiose des gonocytes.

Le maintien de la protéine β -catenin dans les cellules germinales par la délétion génétique de *Gsk3 β* confirme que la protéine β -catenin est nécessaire pour réguler l'état de pluripotence de ces cellules. Les cellules germinales pluripotentes continuent de proliférer et n'entrent pas en méiose malgré un environnement somatique normal. Il est donc nécessaire aux cellules germinales d'inhiber leur état de pluripotence et de se différencier en gonocytes pour acquérir la capacité d'initier la méiose.

De plus, il a été montré que la voie WNT/ β -catenin est régulée par l'E3-ubiquitine ligase antagoniste de la voie WNT, ZNRF3 (Harris et al. 2018). Notre analyse du mutant XX perte de fonction de *Znrf3*^{-/-} indique que les cellules germinales conservent leur état de pluripotence tout en inhibant leur entrée en méiose.

Nos travaux nous amènent à proposer le modèle suivant. Ainsi, avant 13.5 *jpc*, la protéine RSPO1 sécrétée par l'environnement somatique induit l'internalisation de ZNRF3, ce qui a pour conséquence le maintien de l'activité WNT/ β -catenin dans les cellules germinales. A partir de 13.5 *jpc*, l'expression de *Znrf3* augmente et peut ainsi inhiber la voie WNT/ β -catenin en stimulant l'internalisation du complexe récepteur de WNT, induisant la différenciation des cellules germinales et leur entrée en méiose. Le gène *Znrf3* est lui-même un gène cible de la voie WNT/ β -catenin dans d'autres tissus ou modèles d'étude (Peng et al. 2013; Zhou et al. 2013; Harris et al. 2018). Il serait donc intéressant de déterminer si la voie WNT/ β -catenin activée dans les cellules germinales induit l'expression de *Znrf3* ou si un autre facteur, provenant de l'environnement ou des cellules germinales, est nécessaire à initier l'expression de *Znrf3*.

Ces différentes spéculations nous emmènent de plus en plus vers l'hypothèse que RSPO1 participe précocement à la différenciation sexuelle à la fois des cellules somatiques et germinales, tandis que la protéine β -catenin est un effecteur rapide pour allumer/éteindre la pluripotence des cellules germinales.

Il existe de nombreuses évidences que la β -catenin contribue au maintien de la pluripotence (Kielman et al. 2002; N. Sato et al. 2004; Anton, Kestler, et Kühl 2007; Takao, Yokota, et Koide 2007; Wagner et al. 2010; Faunes et al. 2013) *in vitro*. Les protéines POU5F1 et TCF3 ont été décrites comme des acteurs clés du mécanisme permettant de maintenir l'état pluripotent des cellules souches embryonnaires et différents modèles *in vitro* de cellules souches embryonnaires avaient déjà montré que la protéine β -catenin nucléaire interagit physiquement avec la protéine POU5F1 dans le noyau des mESCs (Kelly et al. 2011; Faunes et al. 2013).

Mes travaux de thèse décrivent pour la première fois *in vivo* dans la lignée germinale chez la souris, le mécanisme d'action de la protéine β -catenin dans le maintien de l'état de pluripotence des cellules germinales primordiales et dans l'expression des gènes de pluripotence tels que *Pou5f1*, *Ssea1*, *Sox2*, et *Nanog*. Ensuite, le complexe β -catenin/POU5F1 est adressé à la membrane via CDH1 et est à l'origine de la perte de pluripotence des cellules germinales, de l'arrêt de leur prolifération et de leur entrée en différenciation.

Pour conclure, cette étude nous permet de mettre en évidence un nouveau mécanisme *in vivo* de la différenciation des cellules germinales XX régulée par la protéine β -catenin. Les cellules germinales requièrent une régulation temporelle très fine de la voie canonique WNT/ β -catenin pour permettre leur prolifération et leur différenciation.

Les mécanismes régulant la prolifération des cellules germinales XX ne sont actuellement pas clairs. Nos travaux montrent que la voie WNT/ β -catenin est impliquée dans la régulation de la prolifération des cellules germinales des deux sexes, dans les individus XX et XY. Les cellules germinales XX et XY passent par des processus similaires de maturation (prolifération et méiose), mais elles sont régulées avec un timing spécifique au sexe. Ainsi la prolifération des cellules germinales reprend dans le testicule postnatal avant l'entrée en méiose, elle est associée à l'activation de la signalisation WNT/ β -catenin mais pas à l'expression de *Rspo1* dans les spermatogonies (Golestaneh et al. 2009). Ainsi, dans les souris *Mvh:Cre; Ctnnb1ex3*, l'activation constitutive de la voie β -catenin dans les cellules germinales stimule la prolifération des spermatogonies indifférenciées et l'apoptose des spermatocytes et spermatides, aboutissant à un testicule hypoplasique ne contenant plus que des cellules de Sertoli. Ce travail a été publié dans la revue *Developmental Biology* et se trouve en Annexe 1 (Chassot et al. 2017).

Ainsi, ces résultats impliquent qu'un timing finement régulé de l'activité canonique WNT/ β -catenin est nécessaire à la prolifération et la différenciation des spermatogonies au cours de la spermatogenèse afin d'assurer la fertilité de l'animal. Même s'il y a de grandes différences entre les cellules germinales XX et XY, il est probable que la prolifération et la différenciation des cellules germinales partagent des mécanismes moléculaires similaires utilisant des facteurs conservés tels que *Ctnnb1*.

L'identification des mécanismes précis d'activation et de répression de cette voie de signalisation essentielle apportera de nouvelles informations sur le développement des cellules germinales et l'établissement de la fertilité.

Voie WNT/ β -catenin et accessibilité de la chromatine : de nouvelles perspectives de recherche...

Nos résultats ne permettent cependant pas de conclure sur l'activité transcriptionnelle de la protéine β -catenin dans le maintien de la pluripotence des cellules germinales. En effet, de plus en plus d'études remettent en question l'action transcriptionnelle de la protéine β -catenin dans le maintien de la pluripotence des cellules souches (Takao, Yokota, et Koide 2007; W.-L. Tam et al. 2008; Faunes et al. 2013). Dans notre modèle d'étude, il est à ce stade impossible d'affirmer que l'interaction entre β -catenin et POU5F1 joue un rôle transcriptionnel sur l'expression des gènes ou un rôle dans la régulation de la chromatine.

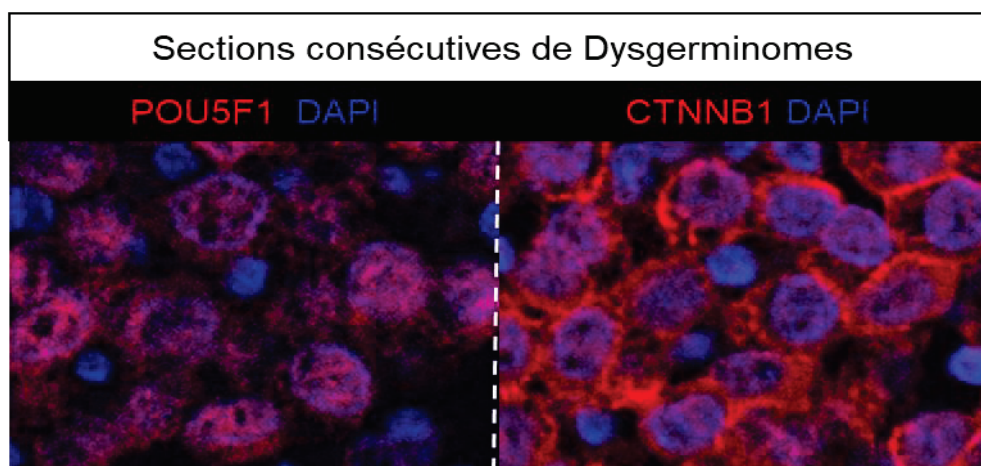
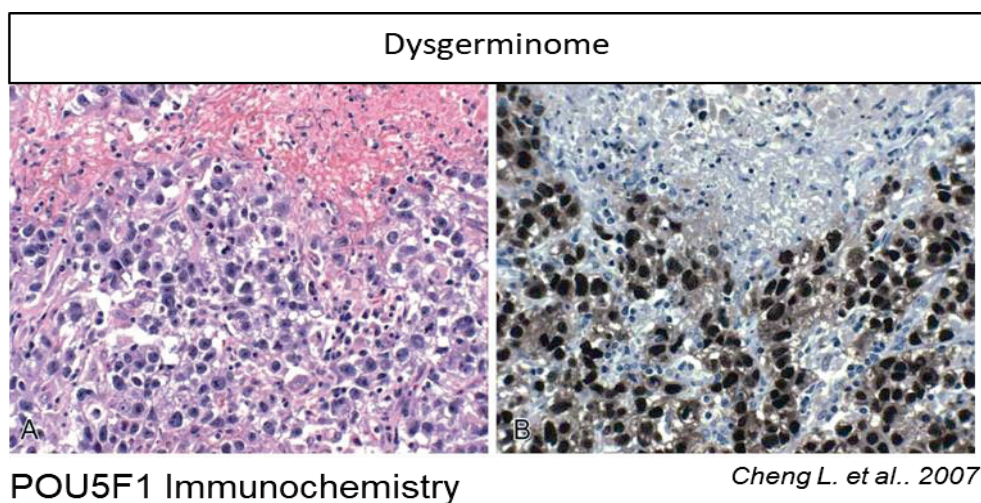
Afin de poursuivre cette étude, nous souhaitons répondre à la question suivante : la protéine β -catenin maintient-elle la pluripotence des cellules germinales par son activité transcriptionnelle ou par des mécanismes épigénétiques ? Pour cela, nous avons débuté des expériences d'ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing). J'ai isolé et purifié par FACS, à partir de gonades de 12.5 *jpc*, des cellules germinales contrôles et déficientes en *Ctnnb1* puis nous les avons confiées au prestataire Active Motif qui réalise actuellement le séquençage des régions accessibles (ouvertes) de la chromatine en présence ou en absence de *Ctnnb1*. Les résultats obtenus nous permettront d'identifier les loci actifs de la chromatine et modifiés selon la présence ou l'absence de *Ctnnb1*, potentiellement impliqués dans la différenciation des cellules germinales.

Des expériences de CHIP-seq (Chromatine ImmunoPrecitation sequencing) sont également en cours de mise au point. La quantité limitée de cellules germinales à 12.5 *jpc* est pour l'instant un frein majeur à la réalisation de cette expérience.

Voie WNT/ β -catenin, pluripotence et tumeurs des cellules germinales :

Il est admis que les tumeurs des cellules germinales se développent pendant la vie fœtale qu'elles ont pour origine une différenciation anormale des cellules germinales primordiales (Dolci, Campolo, et De Felici 2015). Cependant, les événements moléculaires à l'origine de ces cancers restent à identifier pour proposer un diagnostic plus précoce, un pronostic précis et un traitement moins lourd. Nos résultats indiquent que la voie RSPO1/WNT/ β -catenin est impliquée dans la différenciation des cellules germinales et que l'expression de RSPO1 est fortement inhibée après la naissance dans un ovaire sain (Auguste et al. 2011; De Cian et al. 2017). La question d'une réactivation de cette voie de signalisation dans la formation des tumeurs telles que le séminome et le dysgerminome a été posée (Honecker et al. 2004) et n'a jamais été évaluée mécanistiquement à ce jour.

Figure 4 : POU5F1 et β -catenin sont exprimés dans les tumeurs des cellules germinales de l'ovaire



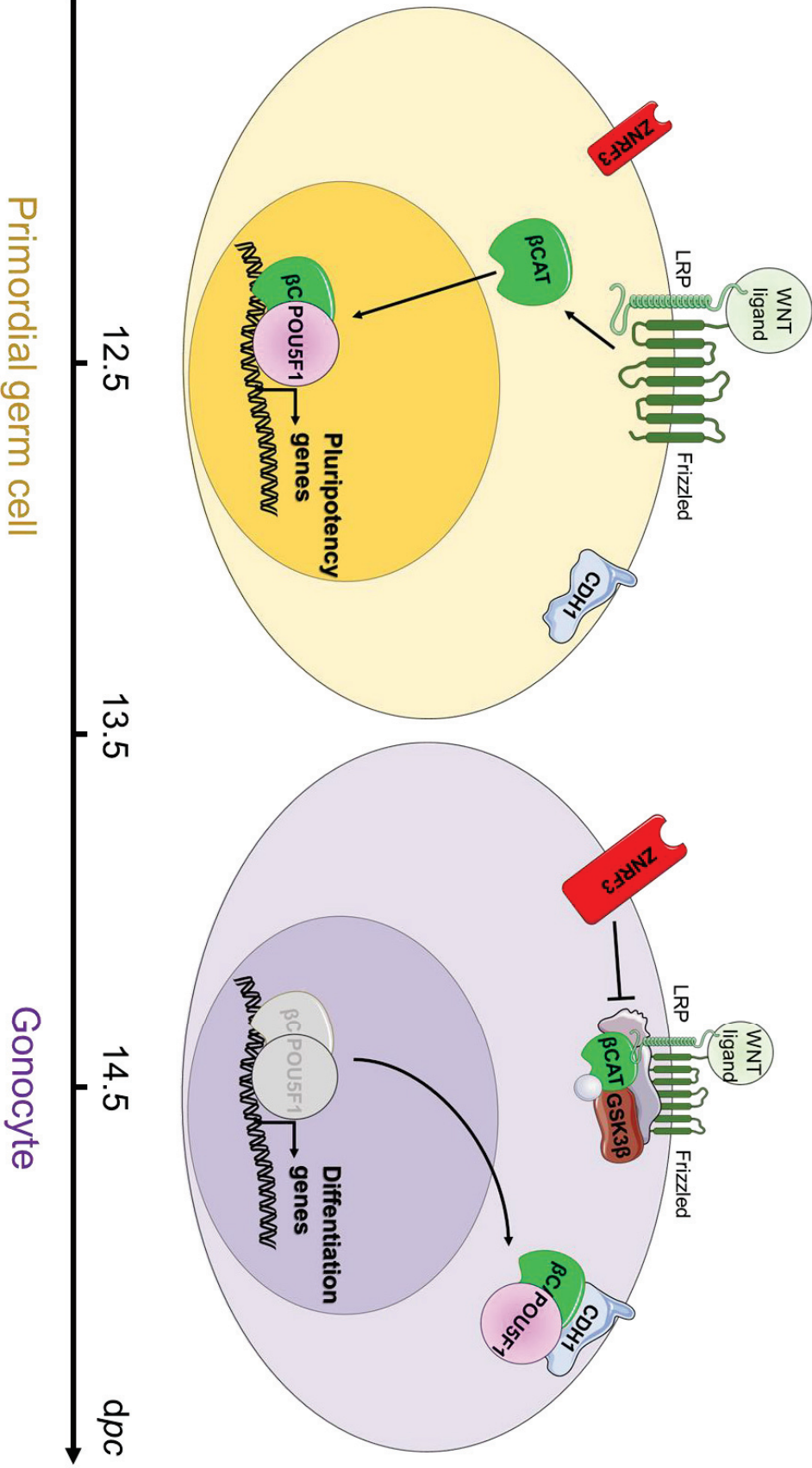
Immunodétection de POU5F1 (gauche/rouge) et de β -catenin (droite/rouge) dans des coupes consécutives d'une tumeur des cellules germinales XX (dysgerminome).

Ces observations font de la voie de signalisation Rspo1/WNT/ β -catenin un signal oncogène pour les cellules germinales et un candidat potentiellement impliqué dans l'apparition des tumeurs des cellules germinales. Mes résultats préliminaires, obtenus en collaboration avec le CHU de Nice Pasteur (Pr. J-F. Michiels, Dr. D. Ambrosetti) qui nous a fourni des échantillons de biopsies de tumeurs des cellules germinales, indiquent que RSPO1 et β -catenin sont exprimées dans les cellules tumorales en prolifération (dysgerminome et séminome), tandis que leur expression n'est pas ou très faiblement détectée dans un ovaire sain. De plus, la réactivation du marqueur POU5F1 (OCT3/4) est fréquemment observée dans tumeurs des cellules germinales (L. Cheng et al. 2007). Nos résultats montrent que β -catenin est également exprimée au noyau des cellules tumorales réexprimant OCT3/4. Cela suggère i) qu'il y a réactivation de la voie RSPO1/WNT/ β -catenin au cours de la prolifération tumorale des cellules germinales, et ii) que la réactivation de la voie RSPO1/WNT/ β -catenin entraîne une réactivation de l'expression des gènes de pluripotence dans les cellules tumorales, ce qui contribue à mieux comprendre l'étiologie de ces cancers.

Conclusions

- Les cellules germinales XX et XY possèdent des mécanismes moléculaires conservés tels que la voie WNT/ β -catenin qui régule la prolifération et la différenciation des gonocytes.
- RSPO1 est un signal provenant de l'environnement somatique qui est nécessaire pour induire la différenciation sexuelle des cellules germinales XX, tandis que ZNRF3 est stimulé pour inhiber la voie WNT/ β -catenin et permettre la différenciation des cellules germinales.
- Une boucle de régulation entre β -catenin et OCT3/4, qui forment des complexes multiprotéiques transitant entre noyau, cytoplasme et membrane cellulaire, déclenche la sortie de la pluripotence dans les cellules germinales primordiales, qui précède leur entrée en différenciation.
- La dérégulation de la voie WNT/ β -catenin dans les cellules germinales est suffisante pour maintenir l'état de pluripotence.
- Ce mécanisme pourrait être réactivé dans le contexte de tumeurs des cellules germinales chez l'Homme.

Schéma de conclusion :



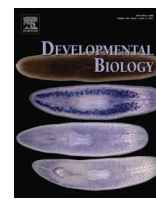
Annexes

Annexe 1 : Constitutive WNT/CTNNB1
activation triggers spermatogonial stem cell
proliferation and germ cell depletion



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/developmentalbiology

Constitutive WNT/CTNNB1 activation triggers spermatogonial stem cell proliferation and germ cell depletion

Anne-Amandine Chassot^{a,*}, Morgane Le Rolle^a, Maxime Jourden^a, Maketo M. Taketo^b, Norbert B. Ghyselinck^c, Marie-Christine Chaboissier^a

^a Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, France

^b Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Kyoto University Yoshida-Konoe-cho, Sakyo, Kyoto, Japan

^c Department of Functional Genomics and Cancer, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, F-67404 Illkirch, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Gonocytes
Spermatogonia
CTNNB1
Canonical WNT signalling
Proliferation
Spermatogenesis

ABSTRACT

The differentiation of germ cells into oogonia or spermatogonia is the first step that eventually gives rise to fully mature gametes. In the female fetal gonad, the RSPO1/WNT/CTNNB1 signalling pathway is involved in primordial germ cell proliferation and differentiation into female germ cells, which are able to enter meiosis. In the postnatal testis, the WNT/CTNNB1 pathway also mediates proliferation of spermatogonial stem cells and progenitor cells. Here we show that forced activation of the WNT/CTNNB1 pathway in fetal gonocytes using transgenic mice leads to deregulated spermatogonial proliferation, and exhaustion of the spermatocytes by apoptosis, resulting in a hypoplastic testis. These findings demonstrate that a finely tuned timing in WNT/CTNNB1 signalling activity is required for spermatogenesis.

1. Introduction

Canonical WNT/CTNNB1 (β -catenin) signalling is activated by the binding of a WNT ligand, like WNT3A, to a multiproteic complex composed by Frizzled receptor and LRP5/6 co-receptors. This binding induces the sequestration of CTNNB1 inhibitors, preventing the proteolysis of and therefore stabilizing CTNNB1 in the cytoplasm. This promotes its translocation into the nucleus where it forms a transcriptional complex with TCF/LEF transcription factors. This complex in turn up-regulates the expression of various target genes, the identity of which depends on the cellular context (de Lau et al., 2014; Niehrs, 2012).

The WNT/CTNNB1 pathway is involved in many developmental processes such as primary embryonic axis formation (McMahon and Moon, 1989), segmentation and patterning in *Drosophila melanogaster* (Baker, 1988; Sampedro et al., 1993; van den Heuvel et al., 1989), bone and muscle development (Borello et al., 2006; Chen et al., 2005; Tajbakhsh et al., 1998), sex determination (Chassot et al., 2008; Maatouk et al., 2008), and specification of the germline lineage. In mice, the canonical WNT/CTNNB1 signalling promotes the epiblast to respond to BMP4 signalling, leading to specification of primordial germ cells (PGCs) (Ohinata et al., 2009). One of the WNT/CTNNB1 targets is

the mesoderm and notochord transcription factor T (Brachyury) (Yamaguchi et al., 1999). In the mouse epiblast, T induces the expression of *Blimp1* and *Prdm14*, the earliest markers of PGC commitment (Aramaki et al., 2013). The PGCs then migrate through the hindgut and dorsal mesentery to colonize the genital ridges at around 10.5 days *post coitum* (dpc) in mice (Ginsburg et al., 1990; McLaren and Durcova-Hills, 2001). PGCs proliferate during their migration prior to sex determination (Campolo et al., 2013). Once PGCs have reached the gonads, they become regulated by both intrinsic and environmental factors. The RNA helicase MVH is required for PGC proliferation in XY gonads, (Tanaka et al., 2000), whereas the secreted protein RSPO1 activates the WNT/CTNNB1 signalling to enhance PGC proliferation in XX gonads (Chassot et al., 2011). Following their proliferation, PGCs differentiate according to their somatic environment (Adams and McLaren, 2002; Hu et al., 2015; McLaren and Southee, 1997; Palmer and Burgoyne, 1991). In XX gonads, PGCs become oogonia and enter meiosis around 13.5 dpc (Adams and McLaren, 2002; McLaren and Southee, 1997). In XY gonads, PGCs become gonocytes by 12.5 dpc (Best et al., 2008; McLaren and Southee, 1997), then are arrested in G0/G1 at 14.5 dpc and remain quiescent until approximately postnatal days 1–2 (1–2 days *post-partum* or dpp) (Dolci and De Felici, 1990; Western et al., 2008).

* Correspondence to: Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV Institut de Biologie Valrose, Center de Biochimie, UFR Sciences, Parc Valrose, 28 avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France.

E-mail address: chassot@unice.fr (A.-A. Chassot).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.04.010>

Received 26 July 2016; Received in revised form 27 March 2017; Accepted 18 April 2017

Available online 26 April 2017

0012-1606/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Between 0 and 2 *dpp*, gonocytes migrate from their original central position in the seminiferous cords toward the periphery, resume proliferation and transform into heterogeneous populations of spermatogonia (Vergouwen et al., 1991; Western et al., 2008). One of these populations promptly differentiates into KIT-positive spermatogonia and gives rise to the first round of spermatogenesis. The other population gives rise to the spermatogonia stem cells (SSC) (Nakagawa et al., 2010). In the adult mice, the prevailing model considers that spermatogonia in the single cell state, known also as A single (As) spermatogonia, are the SSC (Huckins, 1971; Oakberg, 1971). Upon division, As spermatogonia give rise to two paired (Ap) spermatogonia, then to chains of 4–32 aligned (Aal) spermatogonia interconnected by intercellular bridges. Together As, Ap, and Aal are referred to as “undifferentiated spermatogonia”, and As retain a potential for self-renewal (de Rooij, 2001; Yoshida, 2009, 2012). Then Aal spermatogonia undergo transition without division into A1 spermatogonia, which in turn generate A2, A3, A4, intermediate, B spermatogonia by mitotic divisions. Collectively, A₁ to B spermatogonia are referred to as “differentiating spermatogonia” and express KIT membrane receptor (Schrans-Stassen et al., 1999). They are irreversibly committed to differentiation (Chiarini-Garcia and Russell, 2001; Yoshida et al., 2006). Then B spermatogonia divide to generate preleptotene (i.e., premeiotic) spermatocytes. The latter undergo differentiation to spermatozoa through a series of steps giving rise firstly to primary (leptotene, zygotene, pachytene, and diplotene) and secondary spermatocytes, then to round, elongating spermatids and eventually spermatozoa. The differentiating germ cells are arranged into concentric layers from the basement membrane to the lumen of the seminiferous tubules. Premeiotic cells are present in the most peripheral germ cell layer, while meiotic spermatocytes form the central layers and post-meiotic cells (round and elongating spermatids) the layers closest to the lumen (reviewed in (de Rooij and Russell, 2000)).

WNT/CTNNB1 signalling regulates both spermatogonial stem cell proliferation in the adult testis (Takase and Nusse, 2016), and oogenesis proliferation and differentiation in the fetal ovary (Chassot et al., 2011), suggesting a very conserved role of this pathway in germ cell physiology. However, whereas activation of the canonical WNT signalling was occasionally detected in somatic cells such as Sertoli cells, peritubular myoid cells and blood vessel, WNT/CTNNB1 was mainly activated in the undifferentiated spermatogonia (Chassot et al., 2011; Takase and Nusse, 2016), suggesting that the activation of this signalling pathway must be tightly controlled to allow spermatogenesis to proceed. To address the consequences of forcing the activation of the WNT/CTNNB1 pathway in spermatogenesis, we investigated spermatogonia development and spermatocyte formation by using a gain-of-function mutation. Our study showed that forced expression of *Ctnnb1* gene in XY gonocytes stimulates spermatogonia proliferation, blocks their differentiation and induces apoptosis in spermatocytes, leading to spermatogenesis arrest, and to a seminiferous epithelium containing only Sertoli cells and undifferentiated spermatogonia after one month of age.

2. Material and methods

2.1. Mouse strains and genotyping

The experiments described herein were carried out in compliance with the relevant institutional and French animal welfare laws, guidelines and policies. All the experiments were approved by the French ethics committee (Comité Institutionnel d’Ethique Pour l’Animal de Laboratoire; number NCE/2011-12). All mice were kept on a mix background 129/C57BL/6J. Mouse lines were obtained from the Jackson Laboratory. The *Ddx4:Cre Ctnnb1^{ex3/+}* and *mT/mG* mice were described previously and genotyped as reported (Gallardo et al., 2007; Harada et al., 1999; Muzumdar et al., 2007). Genotyping was

performed using DNA extracted from tail tips or ear biopsies of mice.

2.2. Histological analyses

Anesthetized animals were perfused with a 4% (w/v) paraformaldehyde solution, and testes were dissected, fixed in Bouin’s solution overnight, and then embedded in paraffin on the Experimental Histopathology Platform of iBV, CNRS UMR7277-INSERM U1091-UNS. Microtome sections of 5 μ m thickness were stained with hematoxylin and eosin (H & E) according to standard procedures. Pictures were taken with an MZ9.5 microscope (Leica) coupled with a DHC490 camera (Leica) and Leica application suite V3.3.0 software, and processed with Adobe Photoshop.

2.3. Quantitative PCR analyses (QPCR)

Individual gonads were dissected in Phosphate Buffered Saline (PBS) from 2 and 3 *dpp* animals. RNA was extracted using the RNeasy Qiagen kit, and reverse transcribed using the RNA RT-PCR kit (Stratagene). Primers and probes were designed by the Roche Assay Design Center (<https://www.rocheappliedscience.com/sis/rtqpcr/upl/adc.jsp>). All real-time PCR assays were carried out using the LC-Faststart DNA Master kit Roche according to the manufacturer’s instructions. QPCR was performed on cDNA from one gonad and compared to a standard curve. QPCR were repeated at least twice. Relative expression levels of each sample were quantified in the same run and normalized by measuring the amount of *Sdha* cDNA (which represents the total gonadal cells).

2.4. Statistical analysis

For each genotype (n=3), the mean of these 3 absolute expression levels (i.e. normalized) was calculated and graphs of QPCR results show fold of change \pm SEM. All the data were analysed by unpaired one-sided Student’s *t*-test using Microsoft Excel. Asterisks highlight the pertinent comparisons and indicate levels of significance: **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001. Data are shown as mean \pm SEM.

2.5. In-situ hybridization

Samples were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde overnight and then processed for paraffin embedding. Microtome sections of 7 μ m thickness were processed for *in situ* hybridization. *Stra8* digoxigenin-labelled riboprobe was synthesized and *in situ* hybridization analyses were performed as described in (Chassot et al., 2011). Imaging was performed on MZ9.5 microscope (Leica) coupled with a DHC490 camera (Leica) and Leica application suite V3.3.0 software, and processed with Adobe Photoshop.

2.6. Immunological analyses

Samples were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde overnight and then processed for paraffin embedding. Microtome sections of 7 μ m thickness were processed for immunostaining. Immunofluorescence analyses were performed as described in (Chassot et al., 2011). The following dilutions of primary antibodies were used: DDX4 (cat 13840, Abcam) 1:200, WT1 (clone 6F-H12, Dako) 1:300, AMH (C-20, cat sc6886, Santa Cruz) 1:200, SOX9 (cat HPA001758, Sigma) 1:500, SALL4 (cat 29112, Abcam) 1:200, α SMA (cat A5228, Sigma) 1:500, GFR α 1 (cat GT15004, Immune System) 1:200, Phospho Histone H2AX (cat 16193, Millipore) 1:300, MKI67 (clone SP6, cat 9106, Thermo-Scientific) 1:200, CDH1 (cat 610182, BD Transduction Laboratories) 1:100, CyclinD1 (Booster Biological Technology) 1:300, CASP3 (cat AF835, R & D Systems) 1:200, KIT (cat CBL1360, Millipore) 1:300, GFP (cat TP401, Torrey Pines Biolabs), 1:750, 3-bETA HSD (P-18 cat 30820 Santa Cruz), 1:200. Slides were counterstained with 4’,6-

diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted in the mounting medium at 10 µg/ml (Vectashield, Vector laboratories) to detect nuclei. Imaging was performed with a motorized Axio Imager Z1 microscope (Zeiss) coupled with an Axiocam Mrm camera (Zeiss) and images were processed with Axiovision LE and ImageJ. ImageJ software was used for quantification of proliferating germ cells versus total germ cells.

2.7. Immunodetection and quantification of proliferating or apoptotic germ cells

Paraffin sections from each genotype were processed for immunohistological experiments with TRA98 antibody. Then proliferation analysis was performed on the same sections by way of 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine labelling and detection using an appropriate kit (cat 11 296 736 001, Roche). TUNEL analysis was performed with the In Situ Cell Death Detection kit, TMR red (cat 11 684 795 910, Roche). Total germ cells and proliferating or apoptotic cells were quantified on the entire section using ImageJ software. For each picture, the number of MKI67-positive germ cells (proliferating) and the number of CDH1-positive cells (total), or the number of BrdU-positive germ cells and the number of TRA98-positive cells (total germ cells), or the number of TUNEL-positive germ cells and the number of TRA98-positive germ cells (total germ cells) were counted. Then the percentage of MKI67-positive versus CDH1-positive cells germ cells, or the percentage of both BrdU- and TRA98-positive cells versus TRA98-positive cells, or the number of both TUNEL- and TRA98 positive cells versus TRA98-positive cells, was determined. For each genotype (n=4 to 7; 15 pictures per genotype), the mean and mean +SEM of these percentages were calculated and reported on a graph after statistical analysis (for details, see paragraph Statistical Analysis above).

3. Results

Previous experiments have shown that canonical WNT signalling is required for the proliferation of spermatogonia in adult testis, owing to an activation of CTNNB1 in undifferentiated spermatogonia (Takase and Nusse, 2016). We investigated the consequences of inducing the activation of WNT/CTNNB1 signalling in gonocytes before birth. To do so, mice expressing the *Ddx4-Cre* recombinase (Gallardo et al., 2007) were crossed with mice expressing the *Ctnnb1^{ex3/+}* transgene (Harada et al., 1999) to stimulate continuous activation of CTNNB1 in quiescent XY gonocytes from 15.5 days *post coitum* (dpc) onwards (*Ddx4-Cre^{Tr/+};Ctnnb1^{ex3/+}* animals) (Supplementary Fig. 1).

3.1. Forced expression of *Ctnnb1* in XY germ cells does not affect testis development

We first examined whether testis cords properly formed in *Ddx4-Cre^{Tr/+};Ctnnb1^{ex3/+}* testes. We found that WT1, AMH and SOX9, three different markers of Sertoli cells, were expressed in an indistinguishable manner between mutant and control testes from 0 to 15 dpp and quantification of Sertoli cells indicated that their number was not modified (Fig. 1). Moreover, Leydig cell numbers were not significantly changed between control and mutant testes (data not shown). These results indicate that forced expression of *Ctnnb1* in germ cells did not affect the somatic cells of the testis.

3.2. Forced expression of *Ctnnb1* in germ cells eventually induces testis hypoplasia

We then assessed the actual activation of the WNT/CTNNB1 pathway by quantifying the increase in the mRNA levels of *Axin2*, a direct target and universal reporter gene of this pathway (Lustig et al., 2002), and the mRNA levels of *Lef1*, which has also been described as a WNT/CTNNB1 target in human colon carcinoma (Hovanes et al., 2001). At 3 dpp, qPCR analysis indicated that *Axin2* and *Lef1*

respective mRNA levels were significantly increased in *Ddx4-Cre^{Tr/+};Ctnnb1^{ex3/+}* testes in comparison to controls (Fig. 2A).

We performed a time-course analysis and compared the testis weight versus total body weight of control littermates and transgenic animals at 5, 7, 30 and 60 dpp (Fig. 2B). No significant difference in body weight was detected between transgenic and control littermates (not shown). We detected a slight, but significant, increase of the mutant testis weight in comparison to controls at 5 dpp, which was no longer observed at 7 dpp. The testis weight of the mutant males was then significantly lower than the testis weight of the controls at 30 and 60 dpp (Fig. 2B). Macroscopic observation of the testes 3 months after birth (90 dpp) revealed a decrease in size of the *Ddx4-Cre^{Tr/+};Ctnnb1^{ex3/+}* mutants when compared to those of control littermates (Fig. 2C, left panel). Histological analyses suggested that there were less pachytene spermatocytes in the mutant testis compared to the wild-type testis at 15 dpp (Fig. 2C). Then, at 30 dpp, the first round of spermatogenesis was almost complete in the control mice as shown by the presence of spermatids in the seminiferous tubules, whereas the mutant testis exhibited abnormal tubules (around 40% of the total number of seminiferous tubules, data not shown) in which the most advanced stage of differentiation was spermatocytes. After 3 months (90 dpp), a significant number of seminiferous tubules (44.8% ± SEM 2.37, data not shown) contained only spermatogonia and Sertoli cells in the *Ddx4-Cre^{Tr/+};Ctnnb1^{ex3/+}* testis.

3.3. Forced expression of *Ctnnb1* induces spermatogenesis defects

We next studied the expression of DDX4 (or MVH), which labels spermatogonia and spermatocytes (Fujiwara et al., 1994). Germ cells were present in similar amounts in the mutant and control testes at 0, 5 and 15 dpp (Fig. 3). At 30 and 60 dpp, DDX4-positive cells were less abundant in the mutant testis, with some seminiferous tubules being devoid of the central layer of DDX4-positive germ cells (Fig. 3, arrowheads). These results suggest that proper WNT/CTNNB1 signalling in germ cells is involved in their maintenance in the testis.

To understand the reasons for this loss of germ cells, we first analysed whether the gain-of-function of *Ctnnb1* in XY germ cells promoted proliferation of gonocytes in newborn mice at 0 dpp (data not shown) and 2 dpp. We performed immunostaining using MKI67 antibody, which marks all stages of cell-cycle progression, and quantified the number of MKI67-positive spermatogonia versus the number of total spermatogonia (TRA98-positive) (Nakagawa et al., 2010; Tokuda et al., 2007). This showed a significant increase in MKI67-positive germ cells in *Ddx4-Cre^{Tr/+};Ctnnb1^{ex3/+}* testes (Fig. 4A,B). To assess whether forcing WNT/CTNNB1 signalling in germ cells caused quiescent gonocytes to reenter the cell cycle earlier than they did in control testes, we injected Bromo-deoxyUridine (BrdU) over a 2 h frame and quantified the number of BrdU-positive spermatogonia versus total spermatogonia (Fig. 4A). This number was significantly increased in the mutant testes compared to the wild-type ones. All together, our results demonstrate that the number of proliferating spermatogonia was significantly increased in *Ddx4-Cre^{Tr/+};Ctnnb1^{ex3/+}* testes compared to control testes.

3.4. Constitutive activation of WNT/CTNNB1 signalling stimulates cell-cycle progression in undifferentiated spermatogonia

Cell proliferation is closely controlled by binding of regulatory proteins, cyclins, to their catalytic subunits, cyclin-dependent kinases (CDKs). CyclinD1 (CCND1) has been shown to be expressed in proliferating spermatogonia and has been reported as a direct target of canonical WNT signalling (Beumer et al., 2000; Shuttman et al., 1999). We thus examined whether CyclinD1 expression was altered in the mutant testes. At 2 dpp, the number of CCND1-positive spermatogonia was increased in *Ddx4-Cre^{Tr/+};Ctnnb1^{ex3/+}* testes compared to controls (Fig. 4C), and quantification of *Ccnd1* by qPCR indicated that

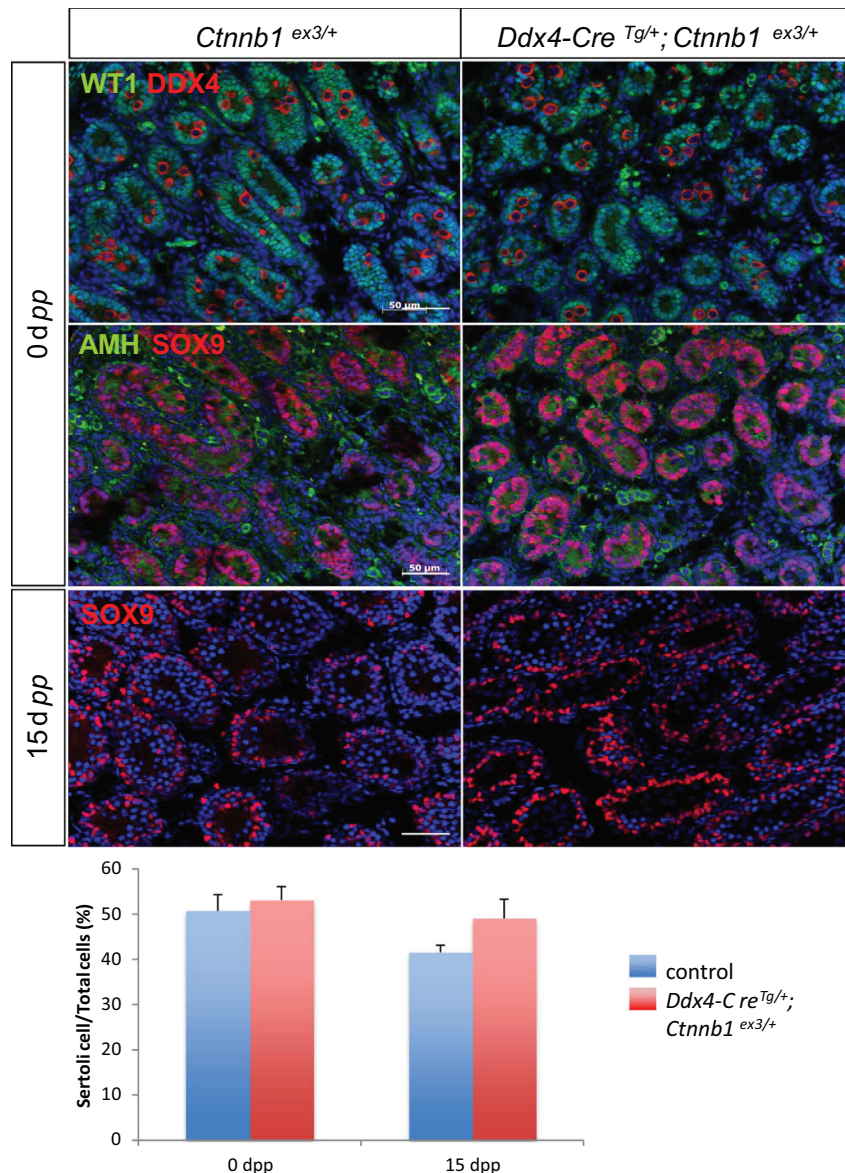


Fig. 1. Induced expression of *Ctnnb1* in germ cells does not affect seminiferous tubules development in testis. Upper panels: Immunodetection of WT1 (green) and DDX4 (red), AMH (green) and SOX9 (red) at 0 dpp, SOX9 (red) at 15 dpp, in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 μ m. Lower panel: Quantification of the percentage of Sertoli cells versus total cells at 0 and 15 dpp, in control (blue histograms) and *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* animals (red histograms).

the *Ccnd1* mRNA levels were significantly increased in the mutant testes, suggesting that activated WNT/CTNNB1 signalling stimulated CyclinD1 expression and cell-cycle commitment into the G1 phase. Moreover, the spermatogonia that remained in the seminiferous epithelium at 30 dpp were also CCND1-positive (Fig. 4C), indicating that proliferation was stimulated also in the spermatogonia at adulthood. These results show that activated WNT signalling promotes undifferentiated spermatogonia proliferation postnatally.

3.5. Spermatogonia differentiation is not impaired when WNT/CTNNB1 activation is forced

We then studied the expression of markers which are, within the testis, specifically expressed in spermatogonia, such as Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α 1 (GFR α 1), a marker of undifferentiated spermatogonia (A_s and A_p only) comprising the actual stem cell pool (Hara et al., 2014), and Sal Like protein 4 (SALL4), a regulator of cell proliferation, which is expressed in gonocytes, in undifferentiated and early differentiating (A_1) spermatogonia (Gassei

and Orwig, 2013). Immunohistological analysis performed in 2 dpp and 0, 2 and 7 dpp testes using GFR α 1 and SALL4 antibodies respectively revealed that the spermatogonia expressed both of these markers (Fig. 5A).

KIT is required for differentiation of gonocytes and A_{al} spermatogonia into A_1 and remains expressed in differentiating spermatogonia (Kissel et al., 2000; Ohta et al., 2003; Sorrentino et al., 1991). Immunohistological analysis revealed that KIT-positive spermatogonia were absent at 2 dpp and normally detected at 7 dpp, in both *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* and control testes (Fig. 5A). Thus, forced activation of the WNT/CTNNB1 signalling does not appear to affect spermatogonia differentiation up to 7 dpp. Quantification of SALL4-positive spermatogonia indicated however that their number was significantly increased at 7 and 30 dpp, i.e. 29.30% (\pm SEM 2.45) of the total cells in the control testes versus 38.81% (\pm SEM 2.21) in the mutant testes at 7 dpp, and 20.84% (\pm SEM 2.51) in the control testes versus 28.99% (\pm SEM 3.44) in the mutant testes at 30 dpp (Fig. 5B).

To investigate whether differentiating spermatogonia could further respond to retinoic acid and eventually progress into meiosis, we

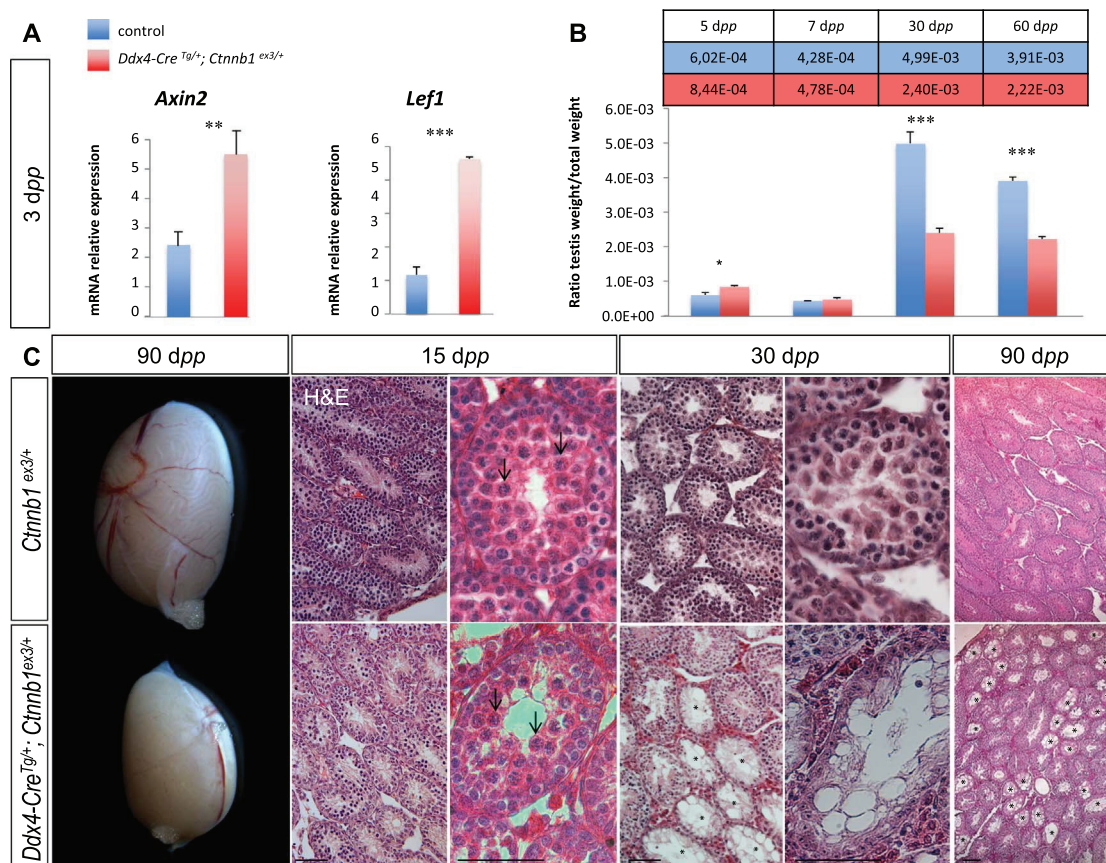


Fig. 2. Forced *Ctnnb1* expression eventually induces a hypoplastic testis. A. Quantitative RT-PCR analysis of *Axin2* and *Lef1* expression in 3 days *post partum* (3 dpp) control (blue) and *Ddx4-Cre^{Tr/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) testes, using *Sdh1* as the normalization control. Bars represent mean \pm SEM, n=3 individual testes. ** p < 0.01; *** p < 0.001. B. Ratio between testis weight versus total body weight at 5, 7, 30 and 60 dpp in control (blue) and *Ddx4-Cre^{Tr/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) littermate animals. The mean of the ratio (testis weight / total body weight) obtained for control and *Ddx4-Cre^{Tr/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* animals is represented on the Y axis. n=4 to 8 testes (from different animals) per genotype. Bars represent mean \pm SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. C. Left panel: Macroscopic view of 3 month-old (90 dpp) testes from control (upper panel) and *Ddx4-Cre^{Tr/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (lower panel) littermate animals. Right panels: Haematoxylin and Eosin staining (H & E) of control (left panel) and *Ddx4-Cre^{Tr/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testis sections at 15, 30 and 90 dpp. Scale bars (black): 50 μ m. Arrows highlight pachytene spermatocytes and asterisks indicate abnormal cords/tubules.

examined by in situ hybridization analyses the expression pattern of *Stra8*, a gene that is characteristic of differentiating type A spermatogonia and preleptotene spermatocytes (Mark et al., 2008). *Stra8*-positive spermatogonia were present inside the tubules at 7 dpp in both mutant and control testes, indicating normal differentiation of type A spermatogonia (Fig. 5C).

Differentiating spermatogonia expressing both SALL4 and KIT were also present in *Ddx4-Cre^{Tr/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* and control testes at 30 dpp (Fig. 5D), indicating that, after one month, differentiation of spermatogonia is still operational in the mutant testes.

3.6. Forced expression of *Ctnnb1* eventually triggers germ cell apoptosis

The absence of DAPI staining in the center of the seminiferous tubules at 60 dpp (Fig. 3) indicated that meiotic and/or post-meiotic cells were missing in *Ddx4-Cre^{Tr/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* testes. To determine whether these germ cells died by apoptosis, we performed TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labelling) assay that allows in situ detection of DNA breaks, a hallmark of cell apoptosis. We then quantified both TRA98- and TUNEL-positive cells (i.e., apoptotic germ cells) versus TRA98-positive cells (i.e., total germ cells) (Fig. 6A). At 5 dpp, 7.65% (\pm SEM 0.88) of the germ cells underwent apoptosis in the mutant testis, while only 1.45% (\pm SEM 0.64) were TUNEL-positive in the control testes. This might explain why we could not detect a significant increase in the germ cell population by 5 dpp whereas there was an increase of proliferation of these cells at 2 dpp (Fig. 3). At 15

dpp, 11,39% (\pm SEM 2.39) of germ cells were apoptotic in the control testes. This ratio was significantly increased up to 23.85% (\pm SEM 3.639) in the mutant testes, indicating that germ cells were eventually undergoing apoptosis when WNT/CTNNB1 was forced. At 30 dpp, we labelled cells with an antibody raised against active (cleaved) Caspase3 (CASP3) (Fig. 6B). Rare CASP3-positive cells were detected in the control testes. In contrast, numerous CASP3-positive cells were observed within the center of the seminiferous tubules in *Ddx4-Cre^{Tr/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* testis. Altogether, these results suggest that the loss of germ cells in the *Ctnnb1* gain-of-function testis was due to apoptosis of germ cells, from 5 dpp onwards.

4. Discussion

In mammals, PGCs proliferate, differentiate and directly enter into meiosis during embryogenesis in female. By contrast, in male, the first wave of PGC proliferation is followed by gonocyte proliferation in the fetal testis, which then is followed by a phase of quiescence until gonocytes resume proliferation as spermatogonia around birth (reviewed by Griswold (2016)). The role of the WNT/CTNNB1 signalling pathway in these processes has been recently questioned with conflicting reports, and it remains not fully understood so far.

In male germ cells, different models of WNT/CTNNB1 loss-of-function both in vitro and in vivo have been shown to induce various phenotypes ranging from normal spermatogenesis to loss of germ cells (Chang et al., 2011; Golestaneh et al., 2009; Kerr et al., 2014; Rivas et al., 2014; Takase and Nusse, 2016). For instance, genetic ablation of

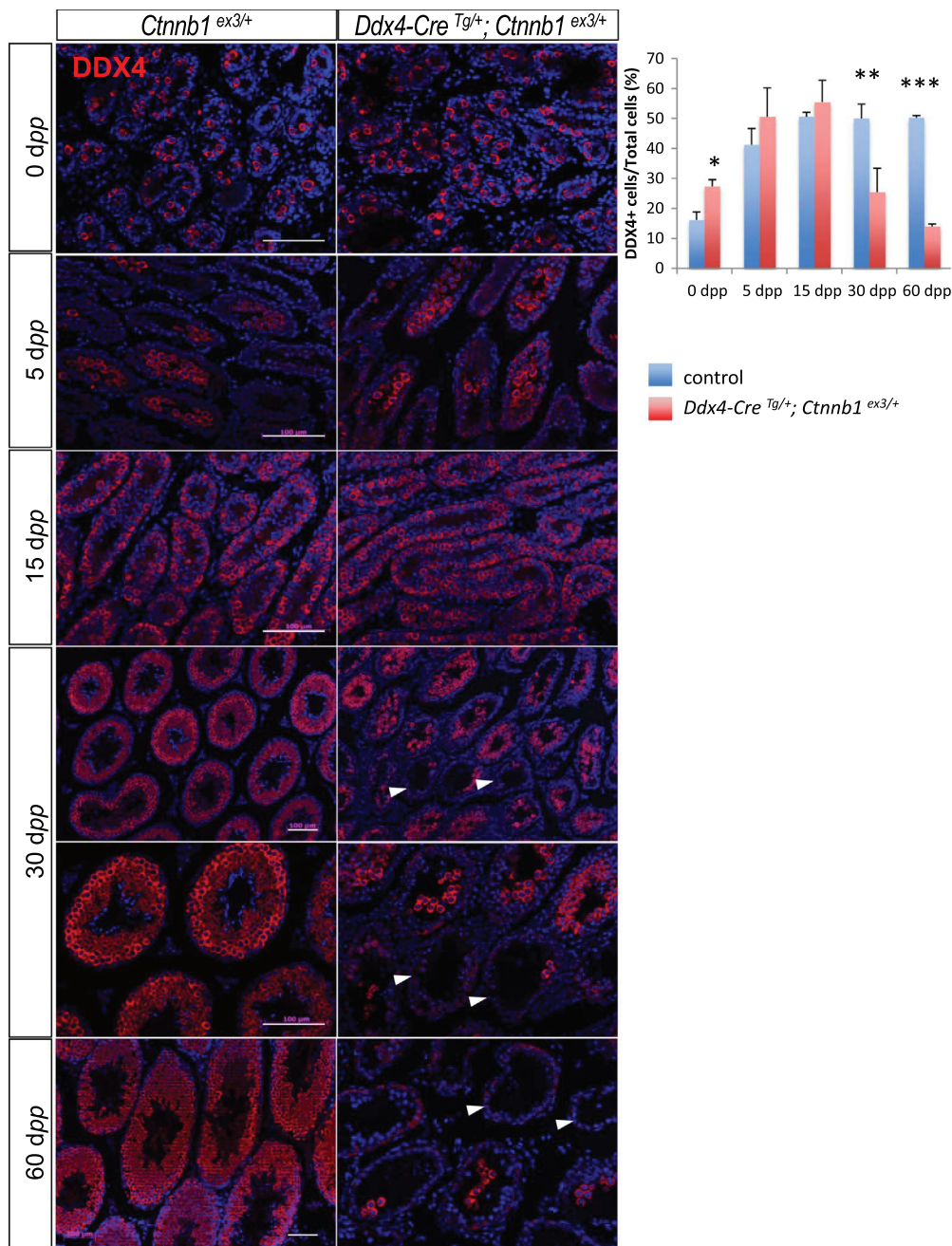


Fig. 3. Forced expression of *Ctnnb1* from the gonocyte stage onwards induces germ cell loss. Immunodetection of DDX4 (red) at 0, 5, 15, 30 and 60 dpp in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 100 μ m. White arrowheads: empty seminiferous tubules. Histograms: quantification of the percentage of DDX4-expressing cells versus total cells at 0, 5, 15, 30 and 60 dpp in control (blue) and *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) testes. Bars represent mean+SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Ctnnb1 using the *Axin2-Cre^{ERT2}* (targeting cells in which the transcriptional *Ctnnb1* activity is normally stimulated, i.e., undifferentiated spermatogonia in this case) resulted in a testicular atrophy (Takase and Nusse, 2016). In this study, *Ctnnb1* ablation was induced at 56 dpp and decreased the proliferation of the undifferentiated spermatogonia without affecting the maintenance of the spermatogonial stem cell pool, triggering a subsequent germ cell loss (Takase and Nusse, 2016). In contrast, ablation of *Ctnnb1* in differentiating spermatogonia and early spermatocytes (using the *Stra8-Cre* which starts to be active at 3 dpp in differentiating type A spermatogonia), allowed proper spermatogenesis to occur (Rivas et al., 2014), while ablation of *Ctnnb1* in spermatids (using the *Prm1-Cre* in which the *Cre* expression is driven by the *Protamine* promoter) led to germ cell loss (Chang et al., 2011). On top of that, ablation of *Ctnnb1* in Sertoli cells and spermatogenic

cells of 7 week-old animals using the *Ah-Cre* (an inducible system in which the *Cre* recombinase is under the control of the cytochrome *P450 1a1* (CYP1A1) promoter element), also led to germ cell loss (Chang et al., 2011; Kerr et al., 2014). Both *Prm1-Cre* and *Ah-Cre* display however leakiness in several cell types, which further complicates interpreting phenotypes of these animals. Moreover, the discrepancy between all these reports could be due to *i*) the different timing of induction for *Cre*-mediated ablation of *Ctnnb1*, ranging from the age of 3 dpp (with *Stra8-Cre*) to 8 weeks (with *Axin2-Cre^{ERT2}*), and *ii*) the different targeted cells, i.e., spermatogonia, spermatocytes, spermatids or Sertoli cells. Nonetheless, these findings present an emerging picture in which *Ctnnb1* acts at multiple sites to influence spermatogenesis and contribute to the functional integrity of the adult seminiferous epithelium.

Different models of ectopic WNT/CTNNB1 activation/stabilization have also been described. *In vivo* stabilization of *Ctnnb1* in the germ cells using the *Tnap-Cre* line (Lomeli et al., 2000) (which is active in

PGC from 9.0 dpc onwards), triggered a delayed cell-cycle progression of the germ cells between 11.5 and 13.5 dpc and a consequent decrease in the germ cell number (Kimura et al., 2006). Nevertheless, sperma-

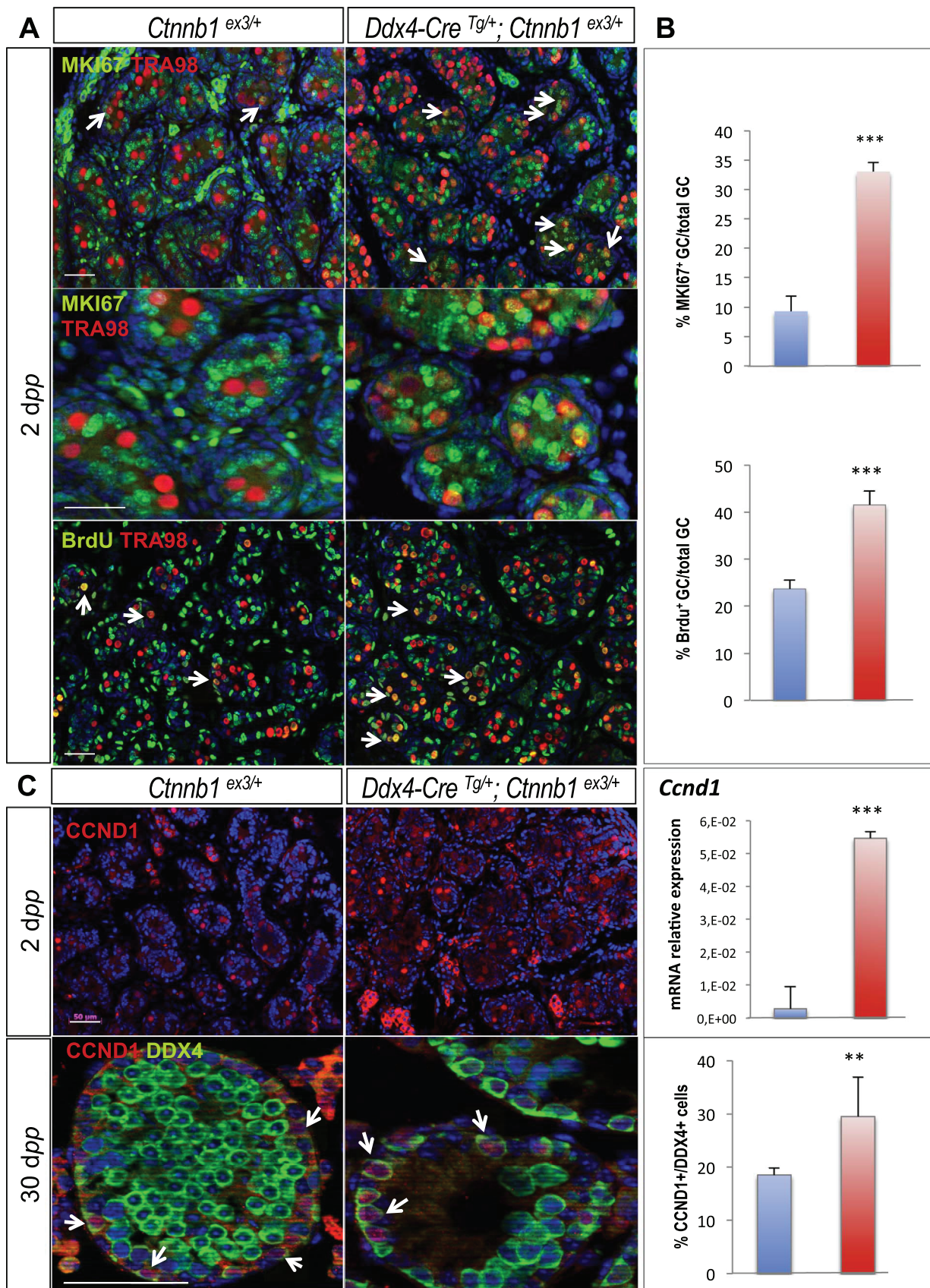


Fig. 4. Forced activation of WNT/CTNNB1 signalling pathway stimulates cell cycle progression in undifferentiated spermatogonia. A. Upper panel: Immunodetection of MKI67 (proliferating germ cells, green) and TRA98 (total germ cells, red) at 2 dpp in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. Lower panel: Immunodetection of BrdU (green) and TRA98 (total germ cells, red) at 2 dpp in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. B. Histograms: Upper panel, percentage of MKI67-positive (proliferating) versus TRA98-positive (total) germ cells in control (blue) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) testes at 2 dpp. Lower panel: Percentage of BrdU-TRA98 double positive (proliferating) versus TRA98-positive (total) germ cells in control (blue) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) testes at 2 dpp. Bars represent mean +SEM, n=15 sections of each genotype 4–7 testes per genotype. C. Immunodetection of CCND1 (CyclinD1, red) at 2 dpp, and immunodetection of CCND1 (red) and DDX4 (green) at 30 dpp in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 μ m. Histogram (upper panel): Quantitative RT-PCR analysis of *Ccnd1* expression in 2 days post partum (2 dpp) control (blue) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) testes, using *Sdha1* as the normalization control. Bars represent mean +SEM, n=3 individual testes. *** p < 0.001. Histogram (lower panel): quantification of the percentage of CCND1-expressing cells versus total cells at 30 dpp in control (blue) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) testes. Bars represent mean+SEM, ** p < 0.01.

togenesis was not analysed in these mutant animals. In contrast, in vitro treatment of cultured mouse SSC or human spermatogonia cultures with WNT3A, an activator of the WNT/CTNNB1 signalling pathway, induced cell proliferation in vitro (Golestaneh et al., 2009; Yeh et al., 2012). This finding is in agreement with the results we described here in vivo using the *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* mouse model. However, further experiments suggested that WNT signalling selectively activates the proliferation of undifferentiated spermatogonia that are committed to differentiation, i.e. spermatogonia that have lost their ability to contribute to stem cell renewal (Yeh et al., 2012).

In addition to proliferation of spermatogonia, we show that constitutive activation of *Ctnnb1* from the gonocyte stage onwards

induces apoptosis up to the spermatocyte stage. Altogether, these findings imply that a finely regulated timing in canonical WNT activity is required for a proper spermatogonia proliferation and differentiation during spermatogenesis to ensure the fertility of the animal. How the activation/silencing of this pathway occurs during spermatogenesis remains to be elucidated.

Even if there are vast differences between male and female germ cells, with no stem cell population present post-natally in the ovary, it is likely that germ cell development shares similar molecular mechanisms using conserved factors such as *Ctnnb1*. Indeed, RSPO1, an activator of the canonical WNT/CTNNB1 signalling pathway (de Lau et al., 2014), is involved in germ cell proliferation in the embryonic

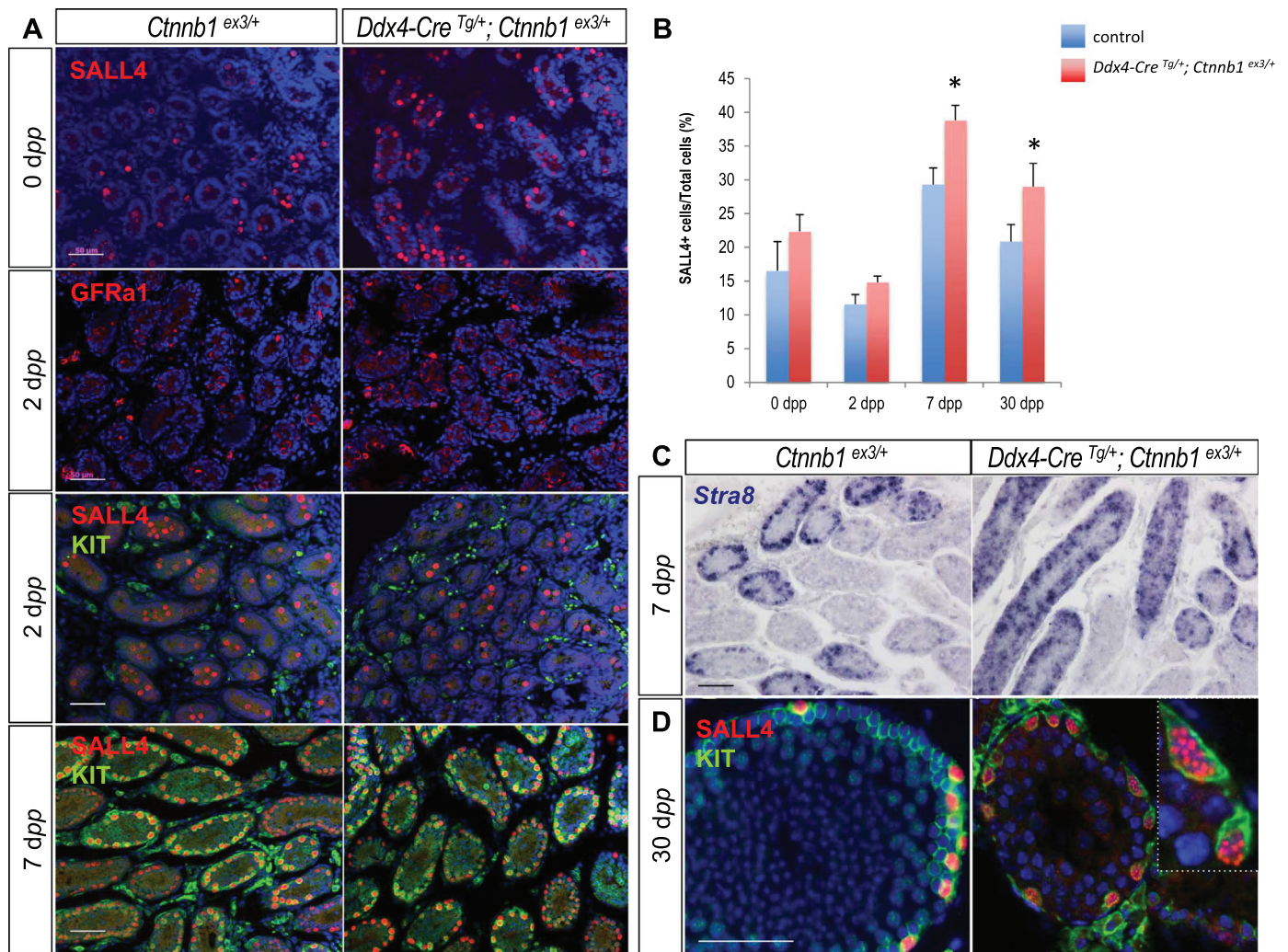


Fig. 5. Forced activation of the WNT/CTNNB1 signalling in germ cells does not impair spermatogonia differentiation. A. Immunodetection of SALL4 (red) at 0 dpp, GFRa1 (red) at 2 dpp and SALL4 (red) and KIT (green) at 2 and 7 dpp, in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. B. Histograms: quantification of the percentage of SALL4-expressing cells versus total cells at 0, 2, 7 and 30 dpp in control (blue) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) testes. Bars represent mean+SEM, ** p < 0.01. C. *In situ* hybridization using *Stra8* riboprobe at 7 dpp in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. Scale bars (black): 50 μ m. Note that spermatocytes present in the center of most tubule sections are not yet STRA8-positive at this post-natal stage. D. Immunodetection of SALL4 (red) and KIT (green) at 30 dpp, in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 μ m. Insert: higher magnification for the immunodetection of SALL4 (red) and KIT (green).

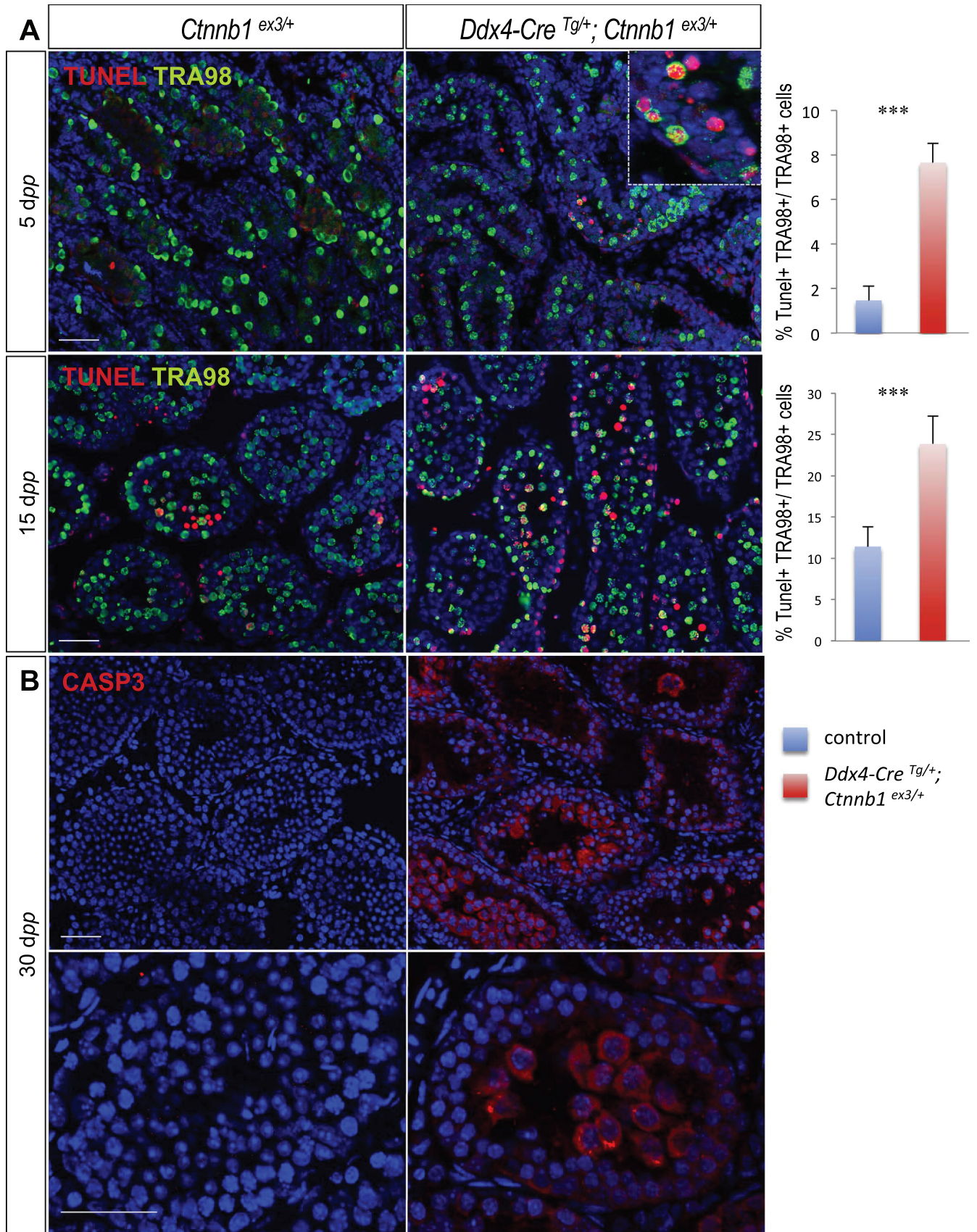


Fig. 6. Forced activation of the WNT/CTNNB1 signalling in germ cells eventually induces spermatocyte apoptosis. **A.** Immunodetection of germ cells (TRA98, green) and apoptotic cells (TUNEL, red) at 5 and 15 dpp in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 μm. Histograms: quantification of the percentage of both TRA98- and TUNEL-positive cells versus TRA98-positive cells at 5 and 15 dpp in control (blue) and *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (red) testes. Bars represent mean +SEM, *** p < 0.001. **B.** Immunodetection of Caspase3 (CASP3, red) at 30 dpp in control (left panel) and *Ddx4-Cre^{Tg/+}; Ctnnb1^{ex3/+}* (right panel) testes. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 μm.

ovary (Chassot et al., 2011). It has now become clear that canonical WNT signalling is also involved in the amplification of undifferentiated spermatogonia prior to meiosis in the testis. Thus, canonical WNT signalling is a general mitogenic process for germ cells and it is conserved between both sexes. Identification of the precise mechanisms of activation and repression of this essential signalling pathway might bring new insight into germ cell development and fertility establishment.

5. Conclusions

Taken together, these results indicate that constitutive activation of the canonical WNT/CTNNB1 signalling pathway in the germ cells leads to the development of a hypoplastic testis and a loss of spermatocytes. We conclude that forced activation of canonical WNT signalling from the gonocyte stage onwards stimulated their proliferation and, ultimately, drove spermatocytes to apoptosis.

Acknowledgments

We would like to thank Laurent Turchi and Samah Rekima for their technical assistance at the Experimental Histopathology Platform of iBV. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV2-0017-02 ARGONADS & ANR-11-LABX-0028-01). MLR was supported by a fellowship from La Ligue Nationale contre le Cancer (2015-2018).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.04.010>.

References

- Adams, I.R., McLaren, A., 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129, 1155–1164.
- Aramaki, S., Hayashi, K., Kurimoto, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Kato, Y., Shirahige, K., Saitou, M., 2013. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev. Cell* 27, 516–529.
- Baker, N.E., 1988. Transcription of the segment-polarity gene wingless in the imaginal discs of *Drosophila*, and the phenotype of a pupal-lethal wg mutation. *Development* 102, 489–497.
- Best, D., Sahlender, D.A., Walther, N., Peden, A.A., Adams, I.R., 2008. Sdmg1 is a conserved transmembrane protein associated with germ cell sex determination and germline-soma interactions in mice. *Development* 135, 1415–1425.
- Beumer, T.L., Roepers-Gajadien, H.L., Gademan, I.S., Kal, H.B., de Rooij, D.G., 2000. Involvement of the D-type cyclins in germ cell proliferation and differentiation in the mouse. *Biol. Reprod.* 63, 1893–1898.
- Borello, U., Berarducci, B., Murphy, P., Bajard, L., Buffa, V., Piccolo, S., Buckingham, M., Cossu, G., 2006. The Wnt/beta-catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. *Development* 133, 3723–3732.
- Campolo, F., Gori, M., Favaro, R., Nicolis, S., Pellegrini, M., Botti, F., Rossi, P., Jannini, E.A., Dolci, S., 2013. Essential role of Sox2 for the establishment and maintenance of the germ cell line. *Stem Cells* 31, 1408–1421.
- Chang, Y.F., Lee-Chang, J.S., Harris, K.Y., Sinha-Hikim, A.P., Rao, M.K., 2011. Role of beta-catenin in post-meiotic male germ cell differentiation. *PLoS One* 6, e28039.
- Chassot, A.A., Gregoire, E.P., Lavery, R., Taketo, M.M., de Rooij, D.G., Adams, I.R., Chaboissier, M.C., 2011. RSP01/beta-catenin signaling pathway regulates oogenesis differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 6, e25641.
- Chassot, A.A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., Chaboissier, M.C., 2008. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1264–1277.
- Chen, A.E., Ginty, D.D., Fan, C.M., 2005. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* 433, 317–322.
- Chiarini-Garcia, H., Russell, L.D., 2001. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol. Reprod.* 65, 1170–1178.
- de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., Clevers, H., 2014. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* 28, 305–316.
- de Rooij, D.G., 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121, 347–354.
- de Rooij, D.G., Russell, L.D., 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21, 776–798.
- Dolci, S., De Felici, M., 1990. A study of meiosis in chimeric mouse fetal gonads. *Development* 109, 37–40.
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., Noce, T., 1994. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12258–12262.
- Gallardo, T., Shirley, L., John, G.B., Castrillon, D.H., 2007. Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre. *Genesis* 45, 413–417.
- Gassei, K., Orwig, K.E., 2013. SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. *PLoS One* 8, e53976.
- Ginsburg, M., Snow, M.H., McLaren, A., 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521–528.
- Golestaneh, N., Beauchamp, E., Fallen, S., Kokkinaki, M., Uren, A., Dym, M., 2009. Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction* 138, 151–162.
- Griswold, M.D., 2016. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiol. Rev.* 96, 1–17.
- Hara, K., Nakagawa, T., Enomoto, H., Suzuki, M., Yamamoto, M., Simons, B.D., Yoshida, S., 2014. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell* 14, 658–672.
- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., Taketo, M.M., 1999. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* 18, 5931–5942.
- Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R.F., Waterman, M.L., 2001. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat. Genet.* 28, 53–57.
- Hu, Y.C., Nicholls, P.K., Soh, Y.Q., Daniele, J.R., Junker, J.P., van Oudenaarden, A., Page, D.C., 2015. Licensing of primordial germ cells for gametogenesis depends on genital ridge signaling. *PLoS Genet.* 11, e1005019.
- Huckins, C., 1971. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169, 533–557.
- Kerr, G.E., Young, J.C., Horvay, K., Abud, H.E., Loveland, K.L., 2014. Regulated Wnt/beta-catenin signaling sustains adult spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* 90, 3.
- Kimura, T., Nakamura, T., Murayama, K., Umehara, H., Yamano, N., Watanabe, S., Taketo, M.M., Nakano, T., 2006. The stabilization of beta-catenin leads to impaired primordial germ cell development via aberrant cell cycle progression. *Dev. Biol.* 300, 545–553.
- Kissel, H., Timokhina, I., Hardy, M.P., Rothschild, G., Tajima, Y., Soares, V., Angeles, M., Whitlow, S.R., Manova, K., Besmer, P., 2000. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J.* 19, 1312–1326.
- Lomeli, H., Ramos-Mejia, V., Gertsenstein, M., Lobe, C.G., Nagy, A., 2000. Targeted insertion of Cre recombinase into the TNAP gene: excision in primordial germ cells. *Genesis* 26, 116–117.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., Behrens, J., 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1184–1193.
- Maatouk, D.M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K.L., Taketo, M.M., Capel, B., 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2949–2955.
- Mark, M., Jacobs, H., Oulad-Abdelghani, M., Dennefeld, C., Feret, B., Vernet, N., Codreanu, C.A., Chambon, P., Ghyselinck, N.B., 2008. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J. Cell Sci.* 121, 3233–3242.
- McLaren, A., Durcova-Hills, G., 2001. Germ cells and pluripotent stem cells in the mouse. *Reprod. Fert. Dev.* 13, 661–664.
- McLaren, A., Southee, D., 1997. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev. Biol.* 187, 107–113.
- McMahon, A.P., Moon, R.T., 1989. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* 58, 1075–1084.
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., Luo, L., 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593–605.
- Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R.E., Yoshida, S., 2010. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* 328, 62–67.
- Niehrs, C., 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 767–779.
- Oakberg, E.F., 1971. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.* 169, 515–531.
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., Saitou, M., 2009. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 137, 571–584.
- Ohta, H., Tohda, A., Nishimune, Y., 2003. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in the w/wv mutant mouse testis. *Biol. Reprod.* 69, 1815–1821.
- Palmer, S.J., Burgoyne, P.S., 1991. XY follicle cells in the ovaries of XO/XY and XO/XY/YYY mosaic mice. *Development* 111, 1017–1019.
- Rivas, B., Huang, Z., Agoulnik, A.I., 2014. Normal fertility in male mice with deletion of beta-catenin gene in germ cells. *Genesis* 52, 328–332.
- Sampedro, J., Johnston, P., Lawrence, P.A., 1993. A role for wingless in the segmental gradient of *Drosophila*? *Development* 117, 677–687.
- Schrans-Stassen, B.H., van de Kant, H.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M., 1999. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology* 140, 5894–5900.
- Shutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., Ben-Ze'ev,

- A., 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5522–5527.
- Sorrentino, V., Giorgi, M., Geremia, R., Besmer, P., Rossi, P., 1991. Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 6, 149–151.
- Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., Cossu, G., 1998. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* 125, 4155–4162.
- Takase, H.M., Nusse, R., 2016. Paracrine Wnt/beta-catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Noce, T., 2000. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14, 841–853.
- Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., Marunouchi, T., 2007. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol. Reprod.* 76, 130–141.
- van den Heuvel, M., Nusse, R., Johnston, P., Lawrence, P.A., 1989. Distribution of the wingless gene product in *Drosophila* embryos: a protein involved in cell-cell communication. *Cell* 59, 739–749.
- Vergouwen, R.P., Jacobs, S.G., Huiskamp, R., Davids, J.A., de Rooij, D.G., 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.* 93, 233–243.
- Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J.A., Burton, M., Sinclair, A.H., 2008. Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells* 26, 339–347.
- Yamaguchi, T.P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N., McMahon, A.P., 1999. T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev.* 13, 3185–3190.
- Yeh, J.R., Zhang, X., Nagano, M.C., 2012. Indirect effects of Wnt3a/beta-catenin signalling support mouse spermatogonial stem cells in vitro. *PLoS One* 7, e40002.
- Yoshida, S., 2009. Casting back to stem cells. *Nat. Cell Biol.* 11, 118–120.
- Yoshida, S., 2012. Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *Reproduction* 144, 293–302.
- Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., Nabeshima, Y., 2006. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 133, 1495–1505.

Annexe 2 : Retinoic Acid signalling is dispensable for meiosis initiation in female mice

Retinoic Acid signalling is dispensable for meiosis initiation in female mice

Anne Amandine Chassot^{1,&}, Morgane Le Rolle¹, Isabelle Stevant², Fabio Da Silva¹, Serge Nef², Andreas Schedl¹, Norbert B. Ghyselinck³ and Marie-Christine Chaboissier¹

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, France

² Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland.

³ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Département de Génétique Fonctionnelle et Cancer, CNRS UMR7104, Inserm U1258, Université de Strasbourg (UNISTRA), 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch cedex, France

[&] Corresponding author:

Anne-Amandine Chassot

Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV

Institut de Biologie Valrose, Centre de Biochimie; UFR Sciences;

Parc Valrose, 28 avenue Valrose,

06108, Nice cedex 2, France.

Tel.: ++33492076451

FAX: ++33492076402

E-mail: chassot@unice.fr

1 **Abstract**

2

3 In mammals, the timing of germ cell entry into meiosis is regulated by signals
4 originating from the gonadal environment. All-*trans* retinoic acid (ATRA) signalling is
5 considered the key pathway that promotes *Stra8* (*Stimulated by Retinoic Acid 8*)
6 expression and, in turn, meiosis entry. This model, however, is debated since it is
7 based upon analysing the effects of exogenous ATRA administration on *ex vivo*
8 gonadal cultures, which may not accurately reflect the role of endogenous ATRA in
9 meiosis initiation. In mice, *Aldh1a1* and *Aldh1a2*, two retinaldehyde dehydrogenases
10 synthesizing ATRA, are expressed in the ovaries when germ cells initiate meiosis.
11 Contrary to the present view, here we demonstrate that ATRA-responsive cells are
12 scarce in the ovary between embryonic days 9.5 and 13.5. Using three distinct gene
13 ablation models for *Aldh1a1;Aldh1a2;Aldh1a3*, we show that *Stra8* expression is
14 independent of ATRA production and that germ cells progress through meiosis in the
15 absence of ATRA signalling. Altogether these data demonstrate that ATRA signalling
16 is dispensable for instructing meiosis initiation in female germ cells.

17

18

19

20 Germ cells exhibit the unique capacity to generate haploid gametes, eventually giving
21 rise to a new embryo after fertilization. In mice, primordial germ cells (PGCs) are
22 specified in the epiblast around 6.25 days *post-coitum* (*dpc*)¹, and colonize the
23 gonads at around 10.5 *dpc*². At this stage, the gonads start differentiating as testes in
24 XY embryos, or as ovaries in XX embryos³. In parallel, germ cells lose pluripotency,
25 becoming either prospermatogonia in testes or oogonia in ovaries, both of which
26 further progress into meiotic divisions⁴. However, the timing of the initiation of
27 meiosis is sexually dimorphic^{5,6}, starting around 8 days *post-partum* in the testis
28 versus 13.5 *dpc* in the ovary.

29 The nature of the signal(s) instructing oogonia to transition from mitosis to meiosis is
30 still debated⁷. Notably, *Stra8* (Stimulated by Retinoic Acid 8) is the only gatekeeper
31 currently described that engages the meiotic program. This is evidenced by the
32 failure of pre-meiotic DNA replication in female *Stra8*-deficient gonads⁸. As *Stra8* was
33 originally identified as an ATRA-responsive gene in P19 embryonic carcinoma
34 cells^{9,10}, ATRA signalling has been proposed as a primary meiosis-instructing factor.
35 This concept is supported by the up-regulation of meiotic markers including *Stra8* in
36 embryonic ovaries cultured *ex vivo* in presence of ATRA and ATRA-receptor (RAR)
37 agonists, or the down-regulation of *Stra8* using pan-RAR antagonists^{11,12}.

38 Nevertheless, these findings have been brought into question by experiments that
39 demonstrated *Stra8* expression and meiosis initiation in embryonic ovaries lacking
40 two of the three ATRA-synthesizing enzymes (ALDH1A2 and ALDH1A3, encoded by
41 the *Aldh1a2* and *Aldh1a3* genes)¹³. Along the same lines, genetic ablation of *Aldh1a1*
42 alone does not impair meiosis, although it reduces *Stra8* expression and delays
43 meiosis initiation¹⁴. In both mouse models, the remaining *Aldh1a* isotype(s) that is
44 (are) remaining may however be sufficient to produce ATRA and, as a result, induce
45 meiosis.

46 To clarify the contribution of endogenous ATRA *in vivo*, we have generated mice
47 deficient for all three *Aldh1a* isotypes either in the somatic cells of the embryonic

48 ovary or ubiquitously. Using this approach, we have successfully abolished ATRA
49 signalling during PGC colonization of the developing gonad. Detailed analysis of the
50 mutant phenotypes revealed that ALDH1A1, ALDH1A2 and ALDH1A3 are
51 dispensable for meiotic initiation in oögonia.

52

53

54 **Results**

55

56 **Expression of ALDH1A1 and ALDH1A2 is restricted to the somatic cells of the** 57 **ovary.**

58 It has been shown that two potential sources of ATRA coexist in the female
59 urogenital ridges. First, the mesonephros, a transient organ adjacent to the gonad,
60 exhibits both *Aldh1a2* mRNA expression at 10.5 and 12.5 *dpc* and a strong ATRA-
61 responsiveness according to the *Tg(RARE-Hspa1b/lacZ)12Jrt* transgenic
62 reporter^{12,15}. Secondly, ALDH1A1 and ALDH1A2 expression has been detected in
63 the somatic cells within the developing ovary at 12.5 and 13.5 *dpc*^{7,14}. These finding
64 suggest the existence of both external and endogenous sources of ATRA in the
65 female gonad at the onset of meiosis initiation.

66 Single-cell RNA sequencing and immune-localization analyses (Fig1. A,B) revealed
67 that *Aldh1a1* expression became readily detectable in the supporting cells of the
68 ovary at the time of meiosis entry (~13.5 *dpc*), as previously reported^{7,14,16}. *Aldh1a2*
69 exhibited robust expression in the somatic progenitor cells of the gonad and in the
70 mesonephros from 10.5 *dpc* until 13.5 *dpc*. At 13.5 *dpc*, *Aldh1a2* was also highly
71 expressed in the supporting cells. *Aldh1a3* mRNA was nearly absent in the ovary as
72 evidenced by transcriptomic analysis (Fig. 1A). All these observations indicate that
73 the somatic cells of the ovary, but not the germ cells, are able to synthesise
74 endogenous ATRA as early as 10.5 *dpc*, i.e. 3 days before meiosis entry.

75

76 **Germ cells respond to ATRA in the developing ovary**

77 Using an ATRA-reporter mouse model carrying the *Tg(RARE-Hspa1b/lacZ)12Jrt*
78 transgene¹⁵, the mesonephros exhibits a strong response to endogenous ATRA,
79 whereas the ATRA-responsiveness is relatively weak in gonads^{12,14}, suggesting that
80 only very few cells are responsive to endogenous ATRA in the ovaries. To
81 investigate the nature and fate of these ATRA-responsive cells, we used a novel
82 transgenic reporter mouse line called *Tg(RARE-Hspa1b-cre/ER^{T2})*, in which retinoic
83 acid response elements (RARE) coupled to the *Hspa1b* minimal promoter drive
84 expression of the tamoxifen (TAM) inducible Cre^{ERT2} recombinase (Da Silva, in
85 preparation), thus allowing cell lineage tracing of ATRA-responsive cells. In this
86 model, the expression of the membrane-tagged GFP from the
87 *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}* reporter¹⁷ is activated in cells that are ATRA-
88 responsive at the time of TAM administration. These cells then become permanently
89 labeled by GFP (Suppl. Fig. 1A). As expected from previous studies^{15,18}, the
90 periocular mesenchyme and the developing heart, two tissues that are sensitive to
91 endogenous ATRA, harbored GFP-positive cells ~24 hours after TAM administration
92 (Suppl. Fig. 1B). We then asked whether germ cells *in vivo* were sensitive to
93 endogenous ATRA. To this aim, TAM was administered to the pregnant females and
94 the gonads from the embryos were collected ~24 hours later for GFP labeling
95 analyses (Fig. 2A). While a small number of somatic (POU5F1-negative) cells were
96 responsive to endogenous ATRA at 9.5 *dpc* (evidenced as GFP-positive cells at
97 10.5 *dpc*), only a few germ cells were ATRA-responsive between 12.5 and 13.5 *dpc*
98 (since they were GFP-positive at 13.5 *dpc*) (Fig. 2A). Confocal microscopy on whole-
99 mount organs further revealed that the vast majority of germ cells were not ATRA-
100 responsive between 13.5 and 14.5 *dpc* since they were GFP-negative at 14.5 *dpc*
101 (Fig. 2B), although there were a few exceptions (arrowheads in Fig. 2B). Thus, less
102 than 5% of germ cells were ATRA-responsive as previously reported¹². We next
103 dissected ovaries at E13.5 and cultured them for 24 hours in the presence of 4-

104 hydroxy-TAM (4-OH-TAM) at either a physiological dose of ATRA¹³ (1 nM) or a
105 pharmacological dose of ATRA (100 nM). DMSO was used as a negative control
106 (Fig. 2C). Immunostaining analysis using anti-GFP and anti-TRA98 (a germ cell
107 marker¹⁹) antibodies demonstrated that germ cells from the *ex vivo* transgenic
108 ovaries lacked GFP-positive germ cells in DMSO treated samples, but were able to
109 respond to a very low concentration of exogenous ATRA (many GFP-positive germ
110 cells in 1 nM ATRA treated samples). As expected, cells of the mesonephros also
111 responded to ATRA treatment^{12,14}. Taken together, these results indicate that the
112 vast majority of germ cells failed to activate ATRA-responsive genes *in vivo*,
113 ultimately questioning the requirement of ATRA for meiosis entry.

114

115 **Generation of three mouse models deficient for *Aldh1a1*;*Aldh1a2*;*Aldh1a3* in**
116 **the embryonic ovaries.**

117 To functionally test the contribution of ATRA signalling to meiosis entry, we
118 performed conditional deletion of all three ATRA-producing enzymes
119 (*Aldh1a1*;*Aldh1a2*;*Aldh1a3* - hereafter referred to as *Aldh1a1-3*) using three distinct
120 Cre driver lines. First, we employed the *Tg(Nr5a1-cre)2Klp* transgenic line (hereafter
121 named *Sf1-cre*) to induce deletion in SF1-positive somatic cells in the gonads from
122 11.5 dpc²⁰. RT-qPCR analysis in *Sf1-Cre*;*Aldh1a1-3*^{flox/flox} embryos at 13.5 dpc
123 demonstrated the efficient loss of mRNA expression for all three *Aldh1a1-3* genes
124 (Fig. 3A). Secondly, we utilised the *Wt1*^{tm2(cre/ERT2)Wtp} strain²¹ (hereafter referred to
125 *Wt1:Cre*^{ERT2}) that expresses a TAM-inducible Cre^{ERT2} recombinase in most, if not all
126 somatic cells of the gonads at 11.5 dpc²². TAM administration at 9.5 and 10.5 dpc or
127 at 10.5 and 11.5 dpc triggered a strong reduction in *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3*
128 mRNA levels at 11.5 and 13.5 dpc (Fig. 3B, Fig. 4A). The highly efficient ablation of
129 ALDH1A1 and ALDH1A2 was further confirmed by immunodetection at 13.5 dpc
130 (Fig. 3D). Next, we used the *Tg(CAG-cre/ERT2)#Rib* line²³ (hereafter referred to as

131 *CGAG-Cre^{ERT2}*), which ubiquitously expresses a TAM-inducible *Cre^{ERT2}* to delete
132 *Aldh1a1-3* in all cell-types. In TAM-treated *CGAG-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries,
133 *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3* mRNA levels were significantly reduced in the
134 gonads, as previously reported²⁴. This was accompanied by loss of ALDH1A1 and
135 ALDH1A2 protein levels at 13.5 dpc (Fig. 3E). To summarize, all three mouse models
136 demonstrated efficient elimination of *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3* expression in
137 the embryonic ovaries.

138

139 **Genetic deletion of all *Aldh1a* isotypes in the embryonic ovaries does not**
140 **impair primordial germ cell proliferation and differentiation.**

141 Because ATRA signalling has been reported to regulate germ cell proliferation in the
142 developing ovary²⁵ we next examined the proliferation of POU5F1- or DDX4-positive
143 germ cells at 11.5 and 12.5 dpc in control and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries
144 treated by TAM at 9.5 and 10.5 dpc. A 3 hour-pulse of BrdU-incorporation
145 permanently labelled the cells transitioning through the S-phase of the cell cycle.
146 Quantification of the number of BrdU-positive germ cells indicated that despite the
147 significant loss of *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3* expression upon TAM treatment
148 (Fig. 4A), proliferation was not affected in *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* gonads
149 (Fig. 4B). Moreover, the pluripotency markers *Pou5f1* (also known as *Oct3/4*), *Sox2*,
150 and *Dazl*, driving oogonia differentiation²⁶, were expressed at similar levels in control
151 and *Aldh1a1-3* deficient gonads at 11.5 and 12.5 dpc (Suppl. Fig. 2). Altogether,
152 these results indicate that the absence of ALDH1A1, ALDH1A2 and ALDH1A3 does
153 not hinder the proliferation or differentiation of PGCs.

154

155 **Germ cells enter meiosis in ovaries lacking all *Aldh1a* isotypes**

156 We next assessed whether germ cells initiated meiosis in the absence of *Aldh1a1-3*
157 using the different mouse models described above. In *Sf1-Cre;Aldh1a1-3^{flox/flox}*
158 embryos, *Stra8* expression was reduced by ~20% at 13.5 dpc (Suppl. Fig. 3A). *Stra8*

159 expression was also reduced at 13.5 dpc in ovaries of *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}*
160 embryos treated by TAM at 9.5 and 10.5 dpc (Suppl. Fig. 3B). Nevertheless, under
161 these conditions, TAM treatment induced frequent embryonic lethality. Accordingly,
162 TAM was administrated at 10.5 and 11.5 dpc in the following experiments, leading to
163 an almost identical decrease of *Aldh1a1* and *Aldh1a2* mRNA expression
164 (Suppl. Fig. 4). Upon this TAM treatment, germ cells in *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}*
165 ovaries expressed *Stra8* at 13.5 dpc although its mRNA levels were reduced by
166 ~25% when compared to controls (Fig. 5A,C). At 14.5 dpc, this deficit was partly
167 compensated in the *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries, suggesting a delay in the
168 onset of *Stra8* expression in the absence of ALDH1A isotypes (Fig. 5B). Strikingly,
169 the reduction in *Stra8* expression did not impair meiosis entry, as evidenced by the
170 normal levels of *Rec8* mRNA, a gene that encodes a component of the cohesin
171 complex accumulating during the meiotic S-phase²⁷ (Fig. 5B), and of *Spo11* mRNA,
172 which is expressed during the leptotene stage of meiotic prophase I²⁸ (Fig. 5A).
173 Altogether, these results demonstrate that abrogating endogenous ATRA signalling
174 by deleting all three *Aldh1a1-3* genes does not impair meiosis entry.
175 We next examined whether meiosis further progressed despite *Aldh1a1-3* ablation by
176 looking at specific chromosomal features of meiosis. During meiotic progression,
177 homologous chromosomes pair and the synaptonemal complex promotes
178 chromosome recombination. Immunodetection of the Synaptonemal Complex Protein
179 3 (SYCP3), which appears in leptotene stage and becomes enriched in the zygotene
180 stage²⁹, revealed similar thread-like synaptonemal complex structures in TAM-treated
181 control and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries (Fig. 5D), further demonstrating that
182 germ cells entered meiosis in the absence of all ALDH1A isotypes. Quantification of
183 the germ cells positive for phospho- γ H2AX, which is associated with DNA double-
184 strand breaks occurring during the leptotene stage³⁰, confirmed these observations
185 (Fig. 5D, Suppl. Fig. 5). Hence, these results demonstrate that female germ cells

186 progress to meiotic prophase even when ALDH1A1, ALDH1A2 and ALDH1A3 are
187 absent from the ovary from 10.5 dpc onwards.
188 In TAM-treated *CGAG-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries, the mRNA levels of meiotic
189 markers such as *Mei1*, *Dmc1*, *Rec8*, *Syce1* and *Spo11* were not significantly
190 changed as evidenced by RT-qPCR and *in situ* hybridization experiments (Suppl.
191 Fig. 6A,B). Accordingly, phospho- γ H2AX expression was comparable between TAM-
192 treated control and *CGAG-Cre^{ERT};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries at 16.5 dpc (Suppl.
193 Fig. 6C). Altogether, these results clearly indicate that the absence of ALDH1A1,
194 ALDH1A2 and ALDH1A3 (thus absence of ATRA) does not prevent meiosis entry in
195 the developing mouse ovary.

196

197

198 **Discussion**

199

200 Evidence that PGCs do not enter meiosis because of an intrinsic autonomous
201 property (i.e. cell division timing) but are rather instructed by a signalling molecule
202 produced by somatic ovarian cells led to a search for a “Meiosis Inducing Substance”
203 (MIS)³¹. Although ATRA has been suggested to be one such MIS, its role in this
204 biological process has been questioned, giving rise to conflicting reports¹¹⁻¹³. In all
205 three distinct models of *Aldh1a1-3* genetic deletion we have used, we observed only
206 a minor decrease in *Stra8* expression, and this reduction was not robust enough to
207 prevent meiosis initiation and germ cells from progressing into meiotic prophase I.
208 Thus, we conclude that ATRA signalling does not initiate but contributes to meiosis
209 by making *Stra8* expression on time. In agreement with our findings, the study from
210 Vernet et al. (this issue) describes a similar delay in expression of *Stra8* and a
211 normal progression into meiosis in fetal ovaries of mice lacking the ATRA-receptors
212 RARA, RARB and RARG. Since the fetal lethality in our different mice models

213 prevented us to study the postnatal ovary, the fate of the ATRA-responsive female
214 germ cells *in vivo* requires further investigations.

215 When identified, *Stra8* was not classified in the class of immediate and early, ATRA-
216 responsive gene, as indicated by the kinetics of its mRNA accumulation in P19
217 pluripotent carcinoma cells treated with ATRA⁹. It was later shown that ATRA
218 regulates the phosphorylation status of the STRA8 protein in P19 cells¹⁰, indicating
219 that ATRA might also control STRA8 posttranslational modifications. The functional
220 relevance of ATRA-induced phosphorylation in STRA8 activity or stability has not
221 been characterized. Nevertheless, our results indicate that *Aldh1a1-3* are not
222 required for *Stra8* expression in germ cells, suggesting that either ATRA does not
223 phosphorylate STRA8 *in vivo*, or STRA8-phosphorylation has no impact on its activity
224 in germ cells. Taken together, our results and those from Vernet et al. indicate that
225 ATRA signalling is clearly dispensable for meiosis entry.

226

227 In PGC-like cells (PGCLCs) derived from embryonic stem cells, *Stra8* expression is
228 induced without ATRA treatment³², further highlighting that ATRA is not instrumental
229 for meiosis initiation in this system and that other signals are responsible for initiation
230 of *Stra8* expression. Indeed, *in vitro* generation of female PGCLGs expressing *Stra8*,
231 SYCP3 and other meiotic markers requires BMPs, which activate TGF β /SMAD
232 signalling. In these experiments, ATRA simply increased the number of meiotic germ
233 cells, indicating that ATRA signaling served to enhance a preexisting situation³².

234 Meiosis initiation is timed by epigenetic factors such as Polycomb Repressive
235 Complex PRC1, that promotes structural modifications of chromatin and
236 consequently times the expression of *Stra8*⁶. In addition, in the absence of *Rspo1*, an
237 activator of WNT/ β -catenin signalling in the female fetal gonad, a proportion of PGCs
238 neither expressed *Stra8* nor entered meiosis³³, suggesting a control of *Stra8*
239 expression by WNT/ β -catenin. Interestingly, the *Msx* genes, which encode

240 homeodomain transcription factors, are direct targets of WNT/ β -catenin signalling in
241 murine embryonic stem cells³⁴, and in mutant embryos lacking both *Msx1* and *Msx2*,
242 germ cells failed to initiate meiosis³⁵. In gonadal cultures, BMP4 stimulates the
243 expression of *Msx1* and *Msx2* that in turn directly regulate *Stra8* expression³⁵,
244 suggesting that TGF β signalling is also involved in *Stra8* regulation. However, in
245 mouse germ cells, the central transducer *Smad4* is dispensable for *Stra8* expression
246 although it is required to up regulate other key genes involved in meiosis³⁶. Finally,
247 the DMRT1 transcription factor also contributes to the switch from mitosis to meiosis
248 by directly regulating *Stra8* expression in female germ cells³⁷. Altogether, these
249 studies indicate that convergent pathways other than ATRA-signalling collaborate to
250 regulate *Stra8* expression and the transition from mitosis to meiosis cycle.

251

252 Early studies based on the observation that female germ cells cultured together with
253 fetal testes were prevented from initiating meiosis^{38,39} led to the concept of a secreted
254 masculinizing Meiosis Preventing Substance (MPS) in the male gonad⁴⁰. The P450
255 enzyme CYP26B1, expressed in the the supporting cells of the fetal testis but not the
256 ovary, has been proposed to be MPS. Analysis of *Cyp26b1*-null mutant mice
257 demonstrated that CYP26B1 activity prevented germ cells from entering into meiosis
258 in male mice^{12,41}. Whereas CYP26B1 is able to degrade ATRA⁴², the data from
259 Kumar et al suggest that CYP26B1 metabolizes a substrate other than ATRA to
260 prevent meiosis initiation¹³. So far, the nature as well as the molecular identity of
261 CYP26B1 substrate(s) in the fetal testis remain unknown.

262 Identifying the molecules controlling the fundamental decision of germ cell to enter
263 meiosis and defining whether they have MPS or MIS functions represents a major
264 challenge for the reproductive medicine community in the upcoming years. The main
265 clinical consequences of defects in germ cell development are infertility and
266 increased susceptibility to germ cell tumours. Therefore, understanding how germ

267 cells change their gene expression profiles in response to somatic signals will
268 provide knowledge on the aetiology of human genetic diseases.

269

270

271 **Methods**

272

273 **Mouse strains and genotyping**

274 The experiments described herein were carried out in compliance with the relevant
275 institutional and European animal welfare laws, guidelines and policies. All the
276 experiments were approved by the French Ministère de l'Éducation Nationale, de
277 l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#3771-
278 2016012110545580v13). All mice were kept on 129/Sv-C57BL/6J a mixt background.
279 Mouse lines were obtained from the Jackson Laboratory. The *Wt1*^{tm2(cre/ERT2)Wtp},
280 *Tg(Nr5a1-cre)2Klp*, *Tg(CAG-cre/ERT2)#Rlb*, *Aldh1a1*^{flox/flox}, *Aldh1a2*^{flox/flox},
281 *Aldh1a3*^{flox/flox} and *Gt(ROSA)26Sor*^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo} mice were described
282 previously and genotyped as reported^{17,20,21,43-45}. Genotyping was performed using
283 DNA extracted from tail tips or ear biopsies of mice. To activate the cre^{ERT2}
284 recombinase in embryos, TAM (cat T5648, Sigma-Aldrich) was directly diluted in corn
285 oil to a concentration of 40 mg/mL, and two tamoxifen (TAM) treatments (200 mg/kg
286 body weight) were administrated to pregnant females by forcefeeding at 9.5 and 10.5
287 dpc or 10.5 and 11.5 dpc. This resulted in embryos in which *Aldh1a1-3* were deleted
288 upon TAM induction when they were carrying the cre^{ERT2} transgene as well as their
289 control littermates. For proliferation assays, 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine (BrdU) (cat
290 B5002, Sigma-Aldrich) was diluted to a concentration of 10 mg/mL in sterile H₂O,
291 was administrated to the pregnant females at a final concentration of 10 µg/mL by
292 intraperitoneal injection, and pregnant females and their embryos were sacrificed
293 after 3 hours.

294

295 **Single cell sequencing**

296 Single-cell RNA sequencing was performed as described in¹⁶. Briefly, somatic cells of
297 developing mouse female gonads were purified by FACS using the Tg(Nr5a1-GFP)
298 at 6 stages of development (10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 16.5 *dpc* and post-natal day 6).
299 Single-cell isolation, reverse transcription and cDNA amplification were performed
300 using the Fluidigm C1 Autoprep system, and single-cell sequencing library prepared
301 with Illumina Nextera XT following Fluidigm protocol. Library were multiplexed and
302 sequenced on an Illumina HiSeq2000 platform with 100bp paired-end reads, at an
303 average depth of 10M reads per single-cell. Obtained reads were mapped on the
304 mouse reference genome (GRCm38.p3) and gene expression quantified in RPKMs
305 (Reads Per Kilobase of exon per Million reads mapped). Cells were clustered using
306 PCA and hierarchical clustering, and cell types were identified according to the
307 expression level of marker genes and gene ontology enrichment tests. Significance
308 of the difference in expression level between cell types was assessed in R version
309 3.6.0, using Wilcoxon-Mann-Whitney tests and p-values were adjusted for false
310 discovery rate using Bonferroni.

311

312 **Quantitative PCR analyses (QPCR)**

313 Individual gonads without mesonephroi were dissected in phosphate buffered saline
314 (PBS) from 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 *dpc* embryos. RNA was extracted using the
315 RNeasy Qiagen kit, and reverse transcribed using the RNA RT-PCR kit (Stratagene).
316 Primers and probes were designed by the Roche Assay Design Center
317 (<https://www.rocheappliedscience.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>). All real-time PCR
318 assays were carried out using the LC-Faststart DNA Master kit Roche according to
319 the manufacturer's instructions. Quantitative PCR (qPCR) was performed on cDNA
320 from one gonad and compared to a standard curve. They were repeated at least
321 twice. Relative expression levels of each sample were quantified in the same run and
322 normalized by measuring *Sdha* expression (which represents the total gonadal

323 cells⁴⁶). For *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3* real-time PCR, the following specific
324 primers were used: 5'-actttcccaccattgagtg-3' and 5'-caccatggatgcttcagaga-3'
325 (*Aldh1a1*), 5'-catggtatcctccgcaatg-3' and 5'-gcgcatttaaggcattgtaac-3' (*Aldh1a2*), and
326 5'-tctgggaatggcagagaact-3' and 5'-ttgatggtgacggtttcac-3' (*Aldh1a3*). For each
327 sample, relative expression levels were quantified and normalized. For each
328 genotype (n=10), the mean of these 10 absolute expression levels (i.e. normalized)
329 was calculated and then divided by the mean of the 10 absolute expression levels of
330 the control samples considered as the reference (=1 when divided by itself), leading
331 to the fold of change.

332

333 **Statistical analysis**

334 For each genotype, the mean of the normalized expression levels was calculated and
335 graphs show mean fold-change +SEM. All the data were analyzed by Student's *t* test
336 using Microsoft Excel. Asterisks highlight the pertinent comparisons and indicate
337 levels of significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Data are shown as mean +
338 SEM.

339

340 ***In-situ* hybridization**

341 Samples were dissected and fixed overnight with 4% (w/v) paraformaldehyde and
342 then processed for paraffin embedding. Microtome sections of 7 μm thickness were
343 processed for *in situ* hybridization. *Stra8* digoxigenin-labelled riboprobe was
344 synthesized and *in situ* hybridization analyses were performed as described ³³.
345 Imaging was performed on MZ9.5 microscope (Leica) coupled with a DHC490
346 camera (Leica) and Leica application suite V3.3.0 software, and processed with
347 Adobe Photoshop.

348

349 **Immunological analyses**

350 Samples were fixed overnight with 4% (w/v) paraformaldehyde and then processed
351 either for paraffin embedding or directly for whole-mount immunostaining. Microtome
352 sections of 5 μ m thickness were processed for immunostaining. Immunofluorescence
353 analyses were performed as described³³. The following dilutions of primary
354 antibodies were used: ALDH1A1 (cat 52492, Abcam) 1:50, ALDH1A2 (cat
355 HPA010022, Sigma) 1:500, CDH1 (cat 610182, BD Transduction Laboratories)
356 1:100, DAZL (cat GTX89448, Genetex) 1:200, DDX4 (cat 13840, Abcam) 1:200,
357 GATA4 (cat 1237, Santa Cruz) 1:200, GFP (cat TP401, Torrey Pines Biolabs), 1:750,
358 POU5F1 (cat 611202, BD Transduction Laboratories) 1:250, phospho- γ H2AX (cat
359 16193, Millipore) 1:300, SOX2 (cat 97959, Abcam) 1:200, SYCP3 (cat 15093,
360 Abcam) 1:200, TRA98 (cat 82527, Abcam) 1:150, FUT4 (SSEA1) (cat 21702, Santa
361 Cruz) 1:200. Slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
362 diluted in the mounting medium at 10 μ g/ml (Vectashield, Vector laboratories) to
363 detect nuclei. Imaging was performed with a motorized Axio Imager Z1 microscope
364 (Zeiss) coupled with an Axiocam Mrm camera (Zeiss) and images were processed
365 with Axiovision LE and ImageJ. ImageJ software was used for quantification of
366 proliferating germ cells versus total germ cells.

367 Whole-organ imaging was performed on a LSM 780 NLO inverted Axio Observer.Z1
368 confocal microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) using a Plan
369 Apo 10X dry NA 0.45 objective. In mono-photon mode, images were acquired using
370 an Argon LASER (488 nm) nm and DPSS 561 nm. The microscope z-drive was used
371 for z acquisitions, and an automated xy stage for multi-position recordings
372 acquisitions (Märzhäuser, Wetzlar, Germany).

373

374 **Immunodetection and quantification of proliferating germ cells**

375 Paraffin sections from each genotype were processed for immunohistological
376 experiments with POU5F1, DDX4 or GATA4 antibody. Then proliferation analysis
377 was performed on the same sections by way of 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine labelling,

378 and detection using an appropriate kit (cat 11 296 736 001, Roche). Total germ cells
379 and proliferating cells were quantified on the entire section using ImageJ software.
380 For each picture, the number of BrdU-positive germ cells (proliferating) and the
381 number of either OCT4 or DDX4-positive cells (total) were counted. Then the
382 percentage of BrdU-positive versus OCT4 or DDX4-positive germ cells, was
383 determined. For each genotype (n= 3 to 7; 15 pictures per genotype), the mean and
384 mean +SEM of these percentages were calculated and reported on a graph after
385 statistical analysis (for details, see paragraph Statistical Analysis above).

386

387

388 **References**

389

- 390 1 Mikedis, M. M. & Downs, K. M. Mouse primordial germ cells: a reappraisal.
391 *International review of cell and molecular biology* **309**, 1-57,
392 doi:10.1016/B978-0-12-800255-1.00001-6 (2014).
- 393 2 Lehmann, R. Germline stem cells: origin and destiny. *Cell stem cell* **10**,
394 729-739, doi:10.1016/j.stem.2012.05.016 (2012).
- 395 3 Nef, S., Stevant, I. & Greenfield, A. Characterizing the bipotential
396 mammalian gonad. *Curr Top Dev Biol* **134**, 167-194,
397 doi:10.1016/bs.ctdb.2019.01.002 (2019).
- 398 4 Kocer, A., Reichmann, J., Best, D. & Adams, I. R. Germ cell sex
399 determination in mammals. *Mol Hum Reprod* **15**, 205-213 (2009).
- 400 5 Adams, I. R. & McLaren, A. Sexually dimorphic development of mouse
401 primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis.
402 *Development* **129**, 1155-1164 (2002).

- 403 6 Yokobayashi, S. *et al.* PRC1 coordinates timing of sexual differentiation of
404 female primordial germ cells. *Nature* **495**, 236-240,
405 doi:10.1038/nature11918 (2013).
- 406 7 Teletin, M., Vernet, N., Ghyselinck, N. B. & Mark, M. Roles of Retinoic Acid
407 in Germ Cell Differentiation. *Curr Top Dev Biol* **125**, 191-225,
408 doi:10.1016/bs.ctdb.2016.11.013 (2017).
- 409 8 Baltus, A. E. *et al.* In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision
410 to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* **38**,
411 1430-1434 (2006).
- 412 9 Bouillet, P. *et al.* Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive
413 genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel
414 mouse gene, Stra1 (mouse LERK-2/Eplg2). *Dev Biol* **170**, 420-433,
415 doi:10.1006/dbio.1995.1226 (1995).
- 416 10 Oulad-Abdelghani, M. *et al.* Characterization of a premeiotic germ cell-
417 specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-
418 responsive gene. *The Journal of cell biology* **135**, 469-477,
419 doi:10.1083/jcb.135.2.469 (1996).
- 420 11 Koubova, J. *et al.* Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic
421 initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2474-2479 (2006).
- 422 12 Bowles, J. *et al.* Retinoid signaling determines germ cell fate in mice.
423 *Science* **312**, 596-600 (2006).
- 424 13 Kumar, S. *et al.* Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by
425 Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nat Commun* **2**, 151
426 (2011).

- 427 14 Bowles, J. *et al.* ALDH1A1 provides a source of meiosis-inducing retinoic
428 acid in mouse fetal ovaries. *Nat Commun* **7**, 10845,
429 doi:10.1038/ncomms10845 (2016).
- 430 15 Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M. & Giguere, V. Expression of a
431 retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific
432 domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes*
433 *Dev* **5**, 1333-1344, doi:10.1101/gad.5.8.1333 (1991).
- 434 16 Stevant, I. *et al.* Dissecting Cell Lineage Specification and Sex Fate
435 Determination in Gonadal Somatic Cells Using Single-Cell
436 Transcriptomics. *Cell reports* **26**, 3272-3283 e3273,
437 doi:10.1016/j.celrep.2019.02.069 (2019).
- 438 17 Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. A global double-
439 fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* **45**, 593-605 (2007).
- 440 18 Molotkov, A., Molotkova, N. & Duester, G. Retinoic acid guides eye
441 morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for
442 retinal dorsoventral patterning. *Development* **133**, 1901-1910,
443 doi:10.1242/dev.02328 (2006).
- 444 19 Ohmura, M. *et al.* Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-
445 4/EGFP transgenic mice. *Arch Histol Cytol* **67**, 285-296 (2004).
- 446 20 Bingham, N. C., Verma-Kurvari, S., Parada, L. F. & Parker, K. L.
447 Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line.
448 *Genesis* **44**, 419-424 (2006).
- 449 21 Zhou, B. *et al.* Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte
450 lineage in the developing heart. *Nature* **454**, 109-113 (2008).

- 451 22 Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D. & Bard,
452 J. B. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing
453 mammalian embryo. *Mech Dev* **40**, 85-97 (1993).
- 454 23 Matheu, A. *et al.* Oncogenicity of the developmental transcription factor
455 Sox9. *Cancer Res* **72**, 1301-1315, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3660
456 (2012).
- 457 24 Minkina, A. *et al.* Retinoic acid signaling is dispensable for somatic
458 development and function in the mammalian ovary. *Dev Biol* **424**, 208-
459 220, doi:10.1016/j.ydbio.2017.02.015 (2017).
- 460 25 Morita, Y. & Tilly, J. L. Segregation of retinoic acid effects on fetal ovarian
461 germ cell mitosis versus apoptosis by requirement for new
462 macromolecular synthesis. *Endocrinology* **140**, 2696-2703 (1999).
- 463 26 Gill, M. E., Hu, Y. C., Lin, Y. & Page, D. C. Licensing of gametogenesis,
464 dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual
465 differentiation of fetal germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7443-
466 7448, doi:10.1073/pnas.1104501108 (2011).
- 467 27 Parisi, S. *et al.* Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid
468 cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission
469 yeast to humans. *Molecular and cellular biology* **19**, 3515-3528,
470 doi:10.1128/mcb.19.5.3515 (1999).
- 471 28 Romanienko, P. J. & Camerini-Otero, R. D. The mouse Spo11 gene is
472 required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular cell* **6**, 975-987
473 (2000).

- 474 29 Yuan, L. *et al.* The murine SCP3 gene is required for synaptonemal
475 complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular*
476 *cell* **5**, 73-83 (2000).
- 477 30 Fernandez-Capetillo, O. *et al.* H2AX is required for chromatin remodeling
478 and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* **4**,
479 497-508 (2003).
- 480 31 Evans, E. P., Ford, C. E. & Lyon, M. F. Direct evidence of the capacity of the
481 XY germ cell in the mouse to become an oocyte. *Nature* **267**, 430-431,
482 doi:10.1038/267430a0 (1977).
- 483 32 Miyauchi, H. *et al.* Bone morphogenetic protein and retinoic acid
484 synergistically specify female germ-cell fate in mice. *EMBO J*,
485 doi:10.15252/embj.201796875 (2017).
- 486 33 Chassot, A. A. *et al.* RSP01/beta-catenin signaling pathway regulates
487 oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary.
488 *PLoS One* **6**, e25641 (2011).
- 489 34 Hussein, S. M., Duff, E. K. & Sirard, C. Smad4 and beta-catenin co-activators
490 functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded
491 expression of Msx2. *J Biol Chem* **278**, 48805-48814,
492 doi:10.1074/jbc.M305472200 (2003).
- 493 35 Le Bouffant, R. *et al.* Msx1 and Msx2 promote meiosis initiation.
494 *Development* **138**, 5393-5402, doi:10.1242/dev.068452 (2011).
- 495 36 Wu, Q. *et al.* Sexual Fate Change of XX Germ Cells Caused by the Deletion
496 of SMAD4 and STRA8 Independent of Somatic Sex Reprogramming. *PLoS*
497 *Biol* **14**, e1002553, doi:10.1371/journal.pbio.1002553 (2016).

498 37 Krentz, A. D. *et al.* DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional
499 activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary. *Dev Biol* **356**, 63-70,
500 doi:10.1016/j.ydbio.2011.05.658 (2011).

501 38 McLaren, A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp*
502 *Biol* **38**, 7-23 (1984).

503 39 Byskov, A. G. & Saxen, L. Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro.
504 *Dev Biol* **52**, 193-200, doi:10.1016/0012-1606(76)90239-6 (1976).

505 40 Best, D., Sahlender, D. A., Walther, N., Peden, A. A. & Adams, I. R. Sdmg1 is
506 a conserved transmembrane protein associated with germ cell sex
507 determination and germline-soma interactions in mice. *Development* **135**,
508 1415-1425 (2008).

509 41 MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P. & Petkovich, M. Apoptotic
510 extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice.
511 *Endocrinology* **148**, 4560-4567 (2007).

512 42 MacLean, G. *et al.* Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing
513 cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with
514 Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev* **107**, 195-201
515 (2001).

516 43 Dupe, V. *et al.* A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde
517 dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment.
518 *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14036-14041 (2003).

519 44 Matt, N. *et al.* Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated
520 by neural crest cells. *Development* **132**, 4789-4800,
521 doi:10.1242/dev.02031 (2005).

522 45 Vermot, J. *et al.* Conditional (loxP-flanked) allele for the gene encoding the
523 retinoic acid-synthesizing enzyme retinaldehyde dehydrogenase 2
524 (RALDH2). *Genesis* **44**, 155-158, doi:10.1002/gene.20195 (2006).
525 46 Jameson, S. A. *et al.* Temporal transcriptional profiling of somatic and
526 germ cells reveals biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse
527 gonad. *PLoS Genet* **8**, e1002575, doi:10.1371/journal.pgen.1002575
528 (2012).

529

530

531 **Acknowledgments**

532 We are grateful to Eric Pailhoux for critical reading of the manuscript. The
533 microscopy was done in the Prism facility, "Plateforme PRISM", and the histological
534 experiments were done at the "Experimental Histopathology Platform" – IBV- CNRS
535 UMR 7277- INSERM U1091-UNS. The help of Magali Mondin, Simon Lachambre
536 and Samah Rekima is acknowledged. This work was supported by grants from the
537 Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV2-0017-02 ARGONADS & ANR-11-
538 LABX-0028-01). M.L.R was supported by a fellowship from La Ligue Nationale contre
539 le Cancer.

540

541 **Author contributions**

542 A.A.C, M.C.C and N.B.G designed the study, analyzed the data and wrote the paper.
543 A.A.C, M.L.R, I.S, F.D.S performed the experiments and analyzed the data. S.N and
544 A.S discussed the results and commented on the manuscript.

545

546 **Competing interests statement**

547 The authors declare no competing interests.

548

549 **Figure Legends**

550

551 **Figure 1: ATRA signalling is active in the developing ovary**

552 a- Violin plots showing the expression of *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3* in the
553 progenitor and supporting cells between 10.5 *dpc* to 16.5 *dpc* and post-natal day 6
554 (E10.5 to E16.5 and P6) determined by single-cell RNAseq analysis of *Sf1*-positive
555 somatic cells from female gonads. Expression values are log-transformed reads per
556 kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM); small points represent
557 expression in individual cells and the white point is the median of expression.

558 Statistical analyses were performed using the Wilcoxon-Mann-Whitney test, and p-
559 value adjusted for false discovery rate.

560 b- Immunodetection of ALDH1A1 or ALDH1A2 (green) and POU5F1 or TRA98 (germ
561 cells, red) in 10.5, 11.5 and 13.5 *dpc* ovaries. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white):
562 50 micrometers.

563

564 **Figure 2: The majority of the germ cells does not response to ATRA before 13.5**
565 ***dpc*.**

566 a- Immunodetection of ATRA-responsive cells (GFP-positive, green) and germ cells
567 (POU5F1- or TRA98-positive cells, red) in 10.5, 11.5 and 13.5 *dpc* *Tg(RARE-*
568 *Hspa1b-cre/ER^{T2})* ovarian sections after Tamoxifen induction (TAM) at 9.5, 10.5 and
569 12.5 *dpc* respectively. DAPI (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 micrometers.

570 b- Immunodetection of ATRA-responsive cells (GFP, green) and TRA98 (germ cells,
571 red) in 14.5 *dpc* *Tg(RARE-Hspa1b-cre/ER^{T2})* whole ovaries after Tamoxifen induction
572 (TAM) at 13.5 *dpc*. Scale bars (white): 50 micrometers. White arrowheads: GFP-
573 positive germ cells.

574 c- Immunodetection of TRA98 (germ cells) (red) and GFP (ATRA-responsive cells)
575 (green) in presence of either DMSO (control) or 1 nM or 100 nM of All-Trans-Retinoic
576 Acid (ATRA) in cultured *Tg(RARE-Hspa1b-cre/ER^{T2})* ovaries from 13.5 to 14.5 *dpc*.

577 Asterisk: GFP-positive cells within the mesonephros.

578

579 **Figure 3: Generation of three mouse models deficient for**

580 ***Aldh1a1;Aldh1a2;Aldh1a3* in the embryonic ovaries.**

581 a. RT-qPCR analysis of *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3* expression in 13.5 dpc

582 control (orange) and *Sf1-Cre;Aldh1a1-3^{flox/flox}* (blue) gonads. Student's *t*-test,

583 unpaired. Bars represent mean +SEM, n = 10 individual gonads. *** p<0.001.

584 b. Upper panel: Protocol of induction of *Aldh1a1-3* deletion (10.5 dpc onwards). TAM:

585 Tamoxifen. Lower panel: Quantitative RT-PCR analysis of *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and

586 *Aldh1a3* expression in 13.5 dpc control (orange) and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}*

587 (blue) gonads. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM, n = 10

588 individual gonads. *** p<0.001.

589 c- Upper panel: Protocol of induction of *Aldh1a1-3* deletion (10.5 dpc onwards). TAM:

590 Tamoxifen. Lower panel: RT-qPCR analysis of *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3*

591 expression in 13.5 dpc control (orange) and *CGAG-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* (blue)

592 gonads. However, the deletion was less efficient than using the *Wt1-Cre^{ERT2}* or the

593 *Sf1-Cre* transgenes. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM, n = 15

594 individual gonads. *** p<0.001.

595 d- Immunodetection of ALDH1A1 or ALDH1A2 (green) and POU5F1 (germ cells, red)

596 in 13.5 dpc control and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries. DAPI (blue): nuclei.

597 Scale bars (white): 50 micrometers.

598 e- Immunodetection of ALDH1A1 or ALDH1A2 (green) and CDH1 (germ cells, red) in

599 13.5 dpc control and *CGAG-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries. DAPI (blue): nuclei.

600 Scale bars (white): 50 micrometers.

601

602 **Figure 4: Genetic ablation of all three *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3* genes**

603 **does not impair germ cell proliferation *in vivo*.**

604 a. Protocol of induction of *Aldh1a1-3* deletion (9.5 dpc onwards). TAM: Tamoxifen.
605 RT-qPCR analysis of *Aldh1a1*, *Aldh1a2* and *Aldh1a3* expression in 11.5 dpc control
606 (orange) and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{fllox/fllox}* (blue) ovaries. Student's *t*-test, unpaired.
607 Bars represent mean +SEM, n = 10 individual gonads. *** p<0.001.
608 b- Immunodetection of BrdU (proliferating cells, green), POU5F1 (primordial germ
609 cells, red) and GATA4 (gonadal somatic cells, cyan) at 11.5 dpc in control (left panel)
610 and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{fllox/fllox}* (right panel) ovaries. Histograms: percentage of
611 BrdU-positive (proliferating) versus POU5F1-positive (total) germ cells in control
612 (orange) and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{fllox/fllox}* (mutant, blue) ovaries at 11.5 dpc.
613 Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean +SEM, n = 10 sections of each
614 genotype (4 to 7 testes per genotype). ns: not significant.
615 Lower panels: Immunodetection of BrdU (proliferating cells, green) and DDX4 (germ
616 cells, red) at 12.5 dpc in control (left panel) and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{fllox/fllox}* (right
617 panel) ovaries. Histograms: percentage of BrdU-positive (proliferating) versus DDX4-
618 positive (total) germ cells in control (orange) and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{fllox/fllox}*
619 (mutant, blue) ovaries at 12.5 dpc. Student's *t*-test, unpaired. Bars represent mean
620 +SEM, n = 10 sections of each genotype (4 to 7 testes per genotype). ns: not
621 significant.

622

623 **Figure 5: Meiosis progression in absence of endogenous ATRA synthesis *in***

624 ***vivo*.**

625 a. RT-qPCR analysis of *Stra8*, *Rec8* and *Spo11* expression in 13.5 dpc control
626 (orange) and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{fllox/fllox}* (blue) ovaries. Student's *t*-test, unpaired.
627 Bars represent mean +SEM, n = 10 individual ovaries. ** p<0.01; ns: not significant.
628 b. RT-qPCR analysis of *Pou5f1*, *Dazl*, *Stra8* and *Rec8* expression in 14.5 dpc control
629 (orange) and *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{fllox/fllox}* (blue) ovaries. Student's *t*-test, unpaired.
630 Bars represent mean +SEM, n = 10 individual gonads. * p<0.05; ns: not significant.
631 c. *In situ* hybridization using *Stra8* riboprobe at 13.5 dpc in control (left panel) and

632 *Wt1-Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* (right panel) ovaries. Scale bars (black): 50
633 micrometers.
634 d. Immunodetection of DAZL (red) and SYCP3 (green) in 16.5 *dpc* control and *Wt1-*
635 *Cre^{ERT2};Aldh1a1-3^{flox/flox}* ovaries. Lower panel: Immunodetection of Phospho Histone
636 gamma H2AX (red) and DDX4 (green) in 16.5 *dpc* control and mutant ovaries. DAPI
637 (blue): nuclei. Scale bars (white): 50 micrometers.
638

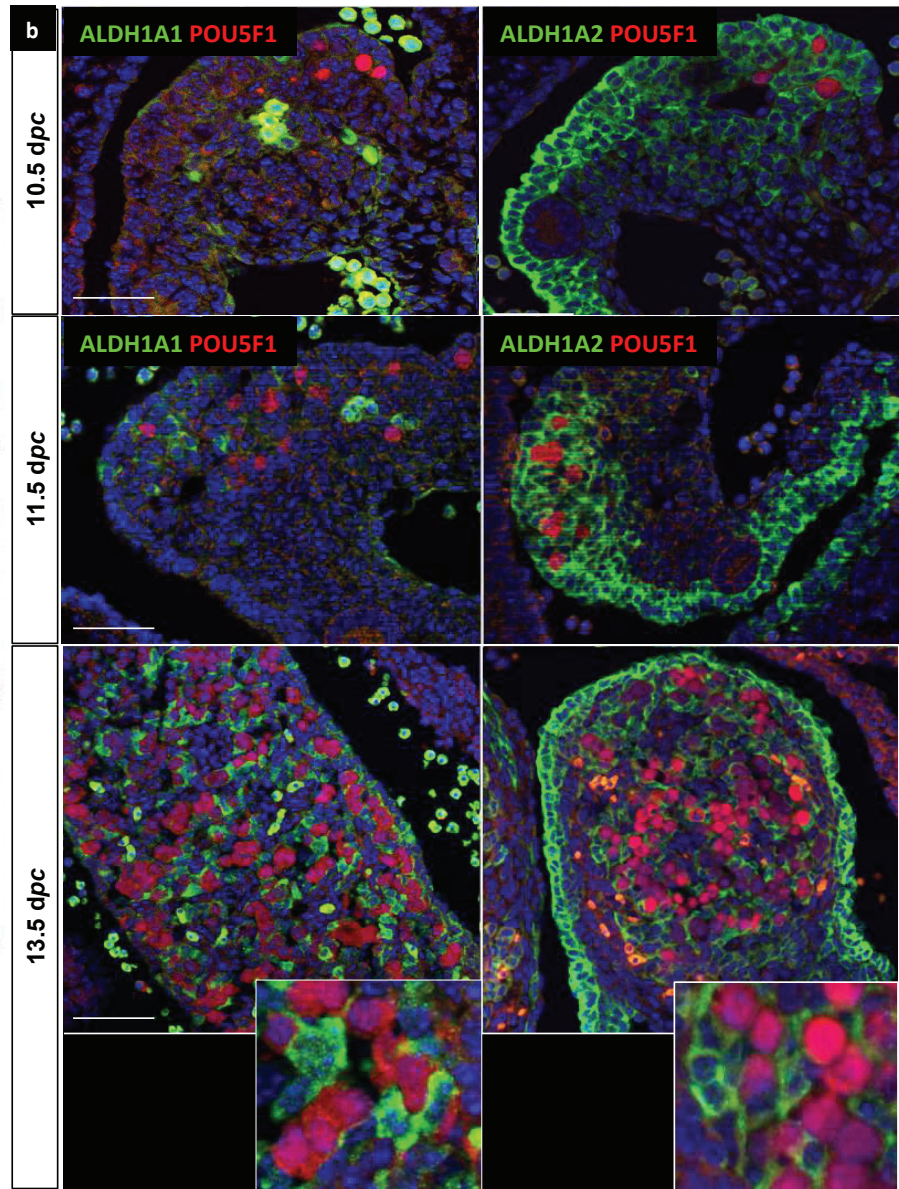
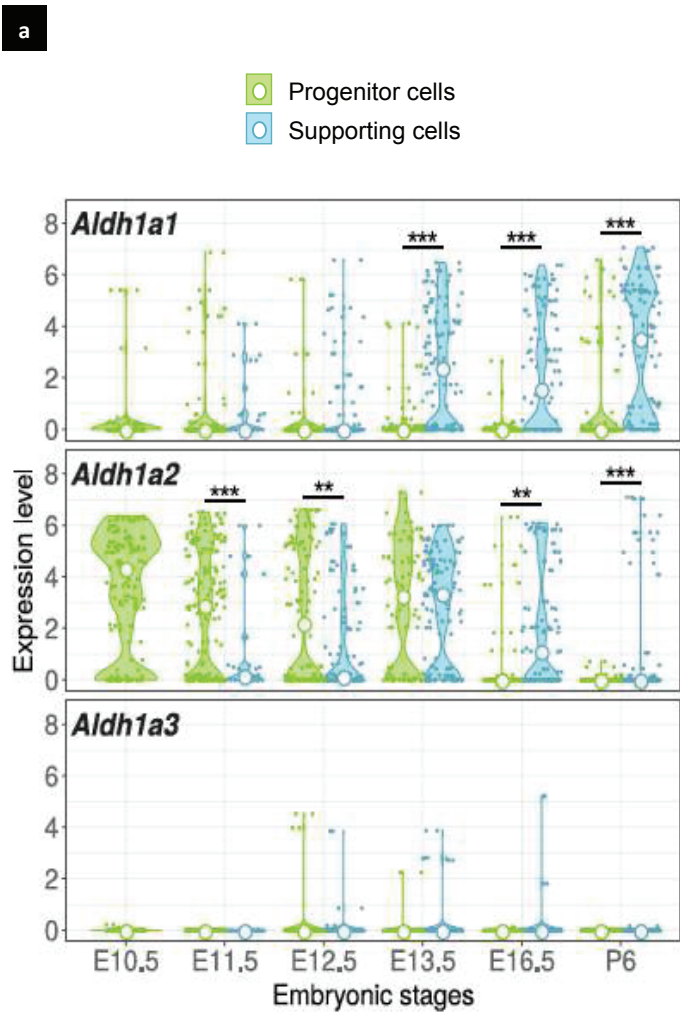
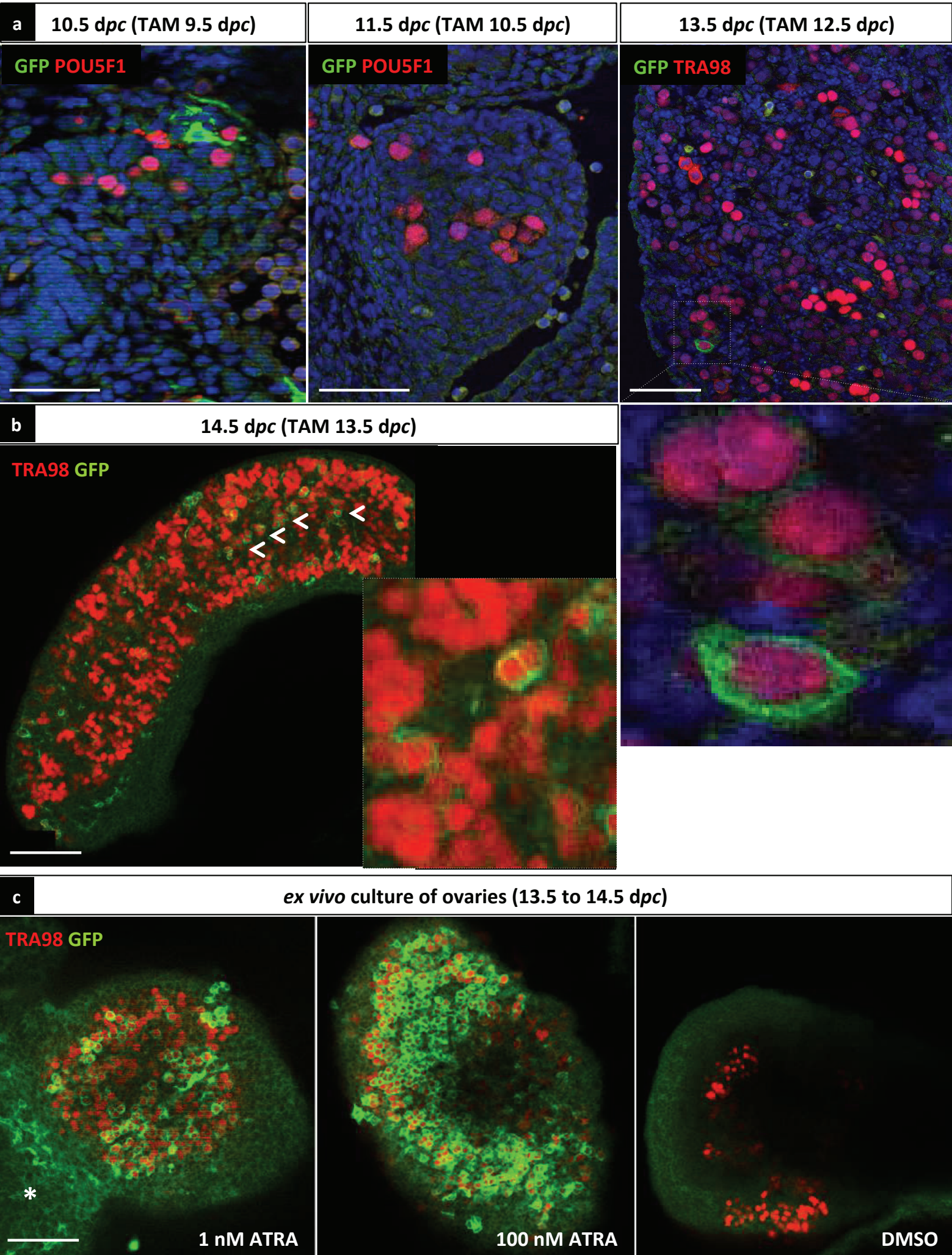


Figure 1

Figure 2



13.5 dpc

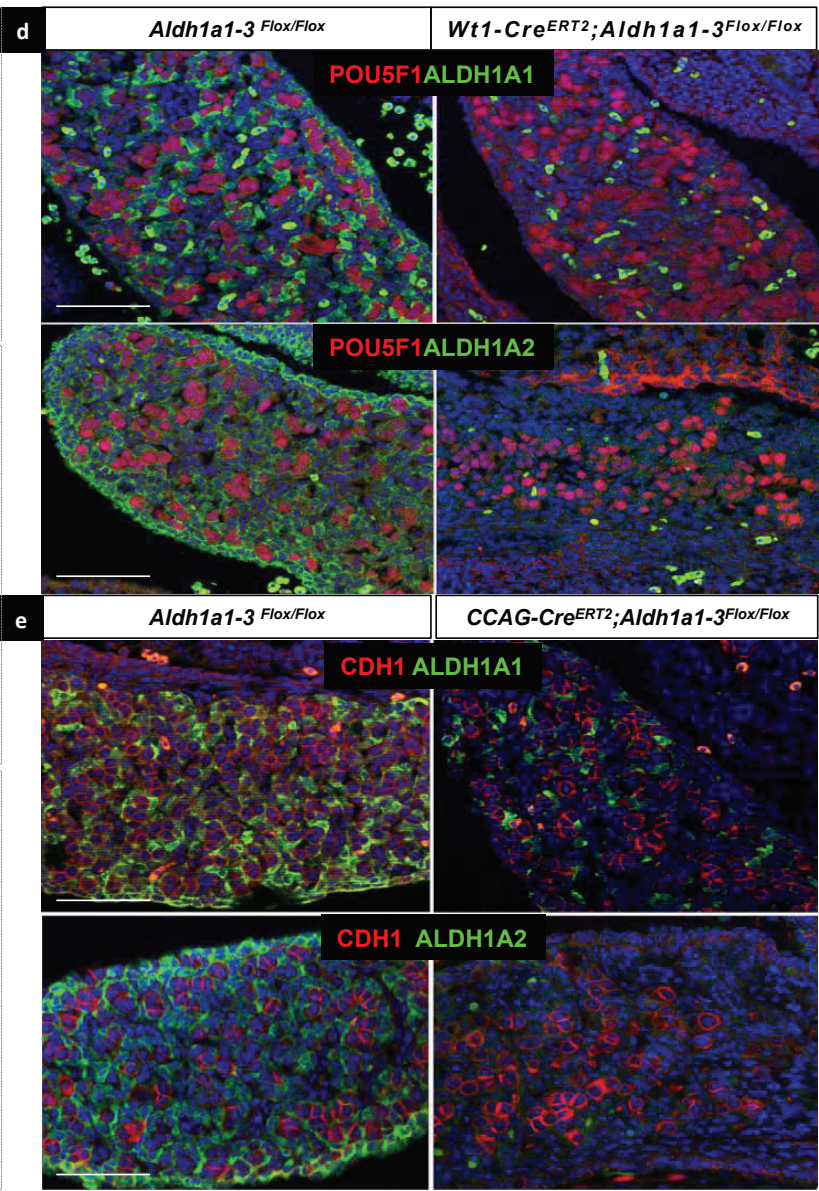
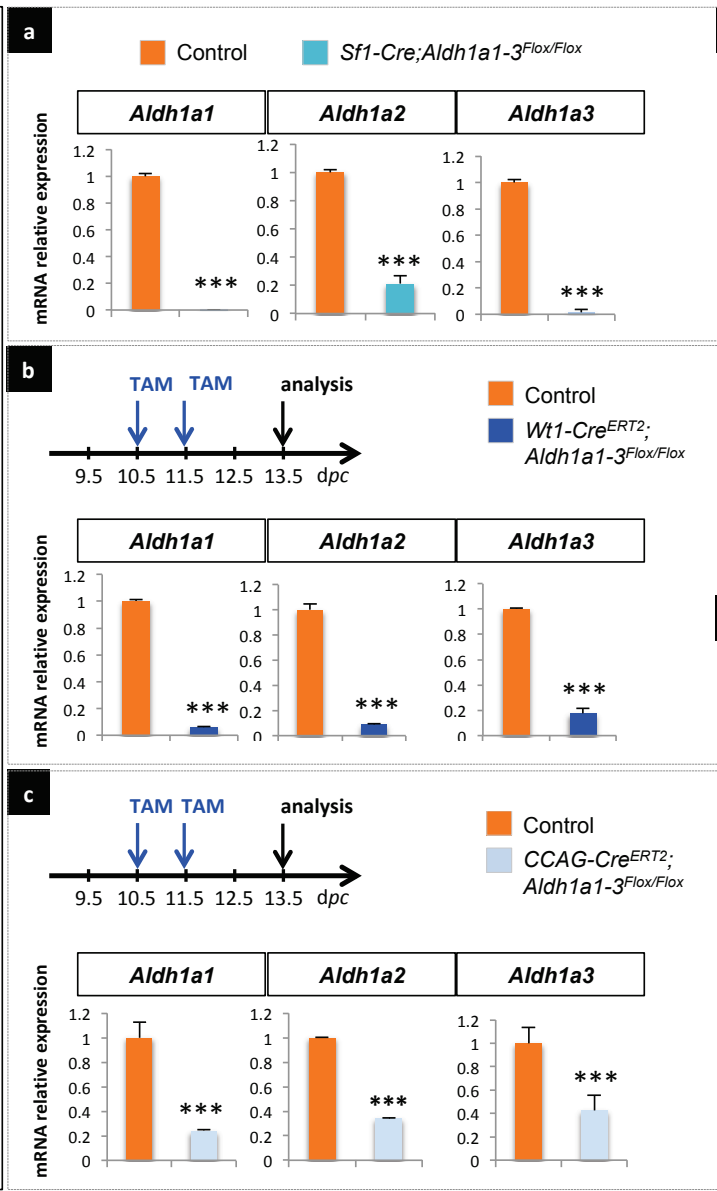


Figure 4

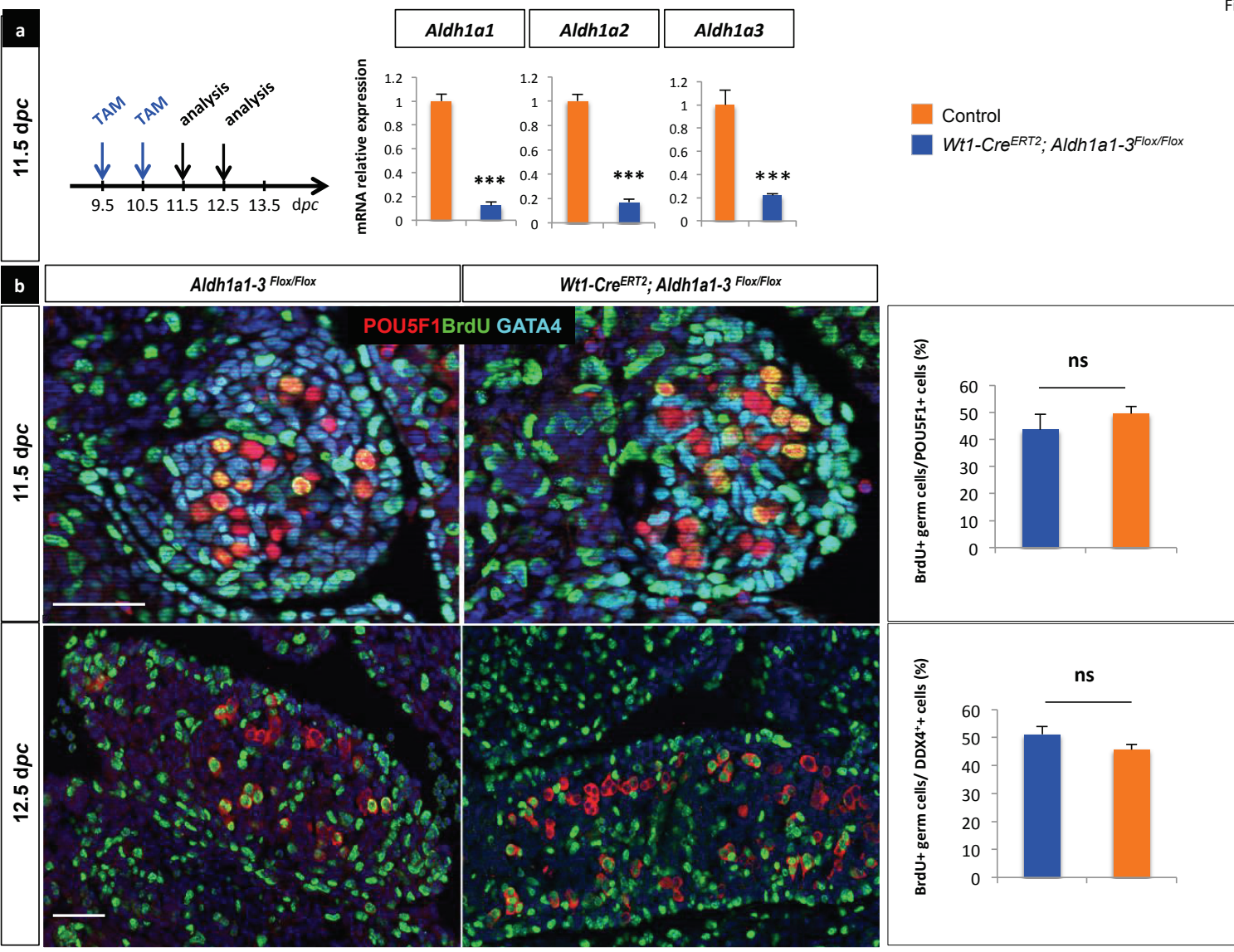
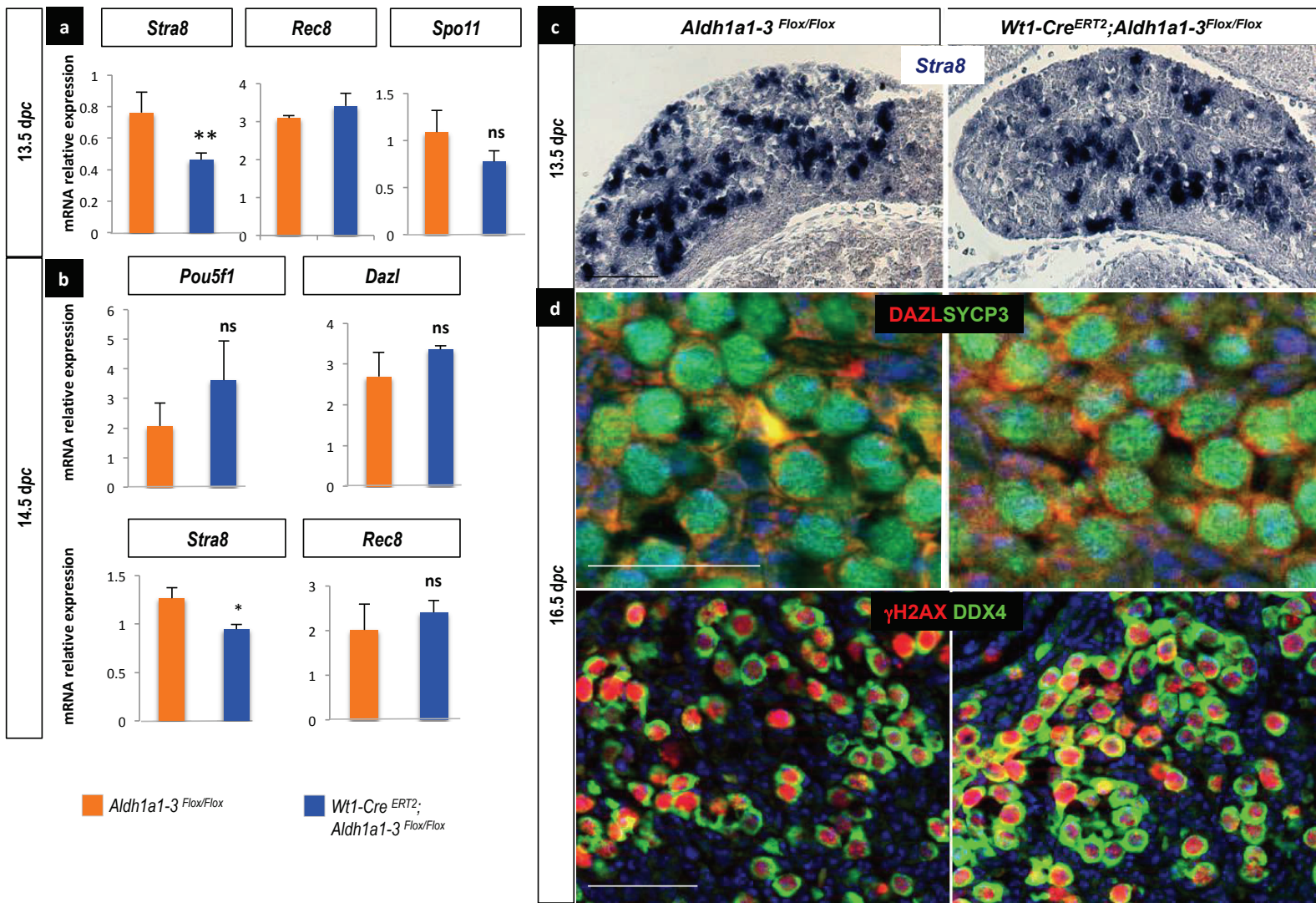


Figure 5



Annexe 3 : R-spondin2 signaling is required for oocyte driven intercellular communication and follicular growth

1 **R-spondin2 signaling is required for oocyte-driven intercellular**
2 **communication and follicular growth**

3
4 Marie-Cécile De Cian^{1,2}, Elodie P. Gregoire¹, Morgane Le Rolle¹, Simon Lachambre¹, Magali
5 Mondin³ Sheila Bell⁴, Céline Guigon⁵, Anne-Amandine Chassot¹ and Marie-Christine
6 Chaboissier^{1,&}.

7
8 ¹ Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, France

9 ² Université de Corte, Corte, France

10 ³ Université de Bordeaux, UMS 3420 CNRS -US4 Inserm, Pôle d'imagerie photonique, France

11 ⁴ Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Ohio, USA

12 ⁵ Université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, ERL U1133, Inserm, France

13
14 [&] To whom correspondence should be addressed:

15 chaboiss@unice.fr

16 iBV, institut de Biologie Valrose,

17 Université Côte d'Azur, UFR Sciences,

18 Centre de Biochimie, Parc Valrose, 28 avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

19
20 **Classification:**

21 Biological Sciences

22
23 **Key words:** Ovary, Oocyte granulosa cell communication, Follicular growth, RSPO2, WNT/ β -
24 catenin (CTNNB1) signaling

25 **Abstract**

26 In mammalian ovaries, follicular growth is required for the development of the egg. This process
27 involves communication between the oocyte and the neighboring somatic (granulosa) cells.
28 While different signaling pathways including KIT and GDF9 signaling are critical for the
29 regulation of this intercellular communication, here we show that R-spondin2 (RSPO2), an
30 activator of the WNT/ β -catenin (CTNNB1) signaling pathway, is also essential for follicular
31 growth. *RSPO2/Rspo2* is expressed in the developing follicles of little girls and mice ovaries. In
32 mice, genetic deletion of this secreted factor prevents follicles from developing beyond the
33 primary stage. Although *Rspo2* expression is restricted to the oocyte, the growth of the oocyte is
34 not impaired by *Rspo2* genetic ablation. In contrast, cell cycle progression of the neighboring
35 granulosa cells is hampered, demonstrating that RSPO2 acts in a juxtacrine manner to sustain
36 granulosa cell proliferation in primary follicles. At a molecular level, RSPO2 promotes the
37 activation of WNT/CTNNB1 signaling in the granulosa cells as evidenced by the transcriptional
38 down-regulation of the *Axin2* reporter. This is corroborated with the restrictive deletion of
39 *Ctnnb1* in granulosa cells, which also leads to a primary follicle arrest. Taken together, our data
40 demonstrate that the activation of WNT/CTNNB1 signaling pathway by RSPO2 is required for
41 oocyte-granulosa cell interactions, in turn maturation of the ovarian follicles and eventually
42 female fertility.

43 .

44 **Significance statement**

45 Ovarian follicles contain two interacting partners, the oocyte and the surrounding granulosa cells.
46 Their communication is essential to follicular growth, a process leading to the release of the
47 fertile gamete, the egg. Here, we show that the oocyte-secreted factor R-spondin2 (RSPO2) is
48 essential to induce follicular growth. RSPO2 activates the WNT/ β -catenin signaling pathway
49 within the granulosa cells of primary follicles that in turn promotes cell cycle progression and
50 eventually their proliferation. Consistent with this, the genetic ablation of RSPO2 induces an
51 arrest of follicle growth. Beside the physiological relevance of this signaling pathway in
52 reproduction, our results show that RSPO2 acts in a juxtacrine manner on oocyte neighboring
53 cells.

54

55

56 **Introduction**

57 In the ovary, cell communication between the oocyte and the neighboring somatic cells, or
58 granulosa cells, is essential for follicular growth that will eventually lead to the release of the
59 oocyte during ovulation. In mice, the primordial follicles assemble perinatally and oocytes
60 become individualized and surrounded by flattened granulosa cells (1, 2). Once formed, most of
61 the primordial follicles enter a resting phase until they are recruited to support an oocyte during
62 the cyclic process of ovulation (3). Their activation requires an interaction between the granulosa
63 cells and the oocyte driven by the granulosa-cell derived factor KITL (Kit Ligand) and the KIT
64 receptor expressed by the oocytes (4, 5). Activated primordial follicles then undergo rapid growth
65 including enlargement of the oocytes and proliferation of the granulosa cells (6, 7). The
66 formation of mature primary follicles begins with a change in the shape of the granulosa cells
67 from flattened to cuboidal cells. This change is followed by a dramatic increase in their
68 proliferation (8, 9). The granulosa cells become more and more packed and adopt a columnar
69 shape with the nucleus becoming adjacent to the basal lamina (10). Follicular growth continues
70 with the formation of a second inner layer of granulosa cells leading to the formation of
71 secondary follicles. Further divisions of granulosa cells give rise to tertiary, antral and pre-
72 ovulatory follicles with more than 50,000 granulosa cells (11).

73
74 During the early phase of growth, the oocyte secretes three glycoproteins, ZP1-3, that contribute
75 to the formation of an extracellular matrix, the zona pellucida, around the oocyte (11). At that
76 time, direct contact between the granulosa cells and the oocyte is mediated by transzonal
77 projections. These specialized filopodia are elaborated by the granulosa cells upon the oocyte-
78 secreted growth differentiation factor-9 (GDF9), cross the zona pellucida to reach the oocyte
79 (12). Accordingly, the lack of GDF9 has a dramatic consequence on follicle development; in its
80 absence a second layer of granulosa cells fail to develop and primary follicles remain (13).
81 Strikingly, the oocyte continues to grow and reaches the size of an antral oocyte capable of
82 resuming meiosis in *Gdf9*^{-/-} ovaries (14).

83
84 R-spondins are secreted proteins that promote activation of the canonical WNT/ β -catenin
85 (CTNNB1) signaling pathway (15, 16). CTNNB1 interacts with the transcription factors LEF or

86 TCF to induce the expression of various target genes including modulators of cell cycle
87 progression (17). WNT/CTNNB1 signaling notably promotes G1 phase progression via up-
88 regulation of *Ccnd1* (CyclinD1) and down-regulation of *Cdkn2a* (p21) (18-20). R-spondins can
89 stimulate cell proliferation by potentiating WNT/CTNNB1 signaling (21, 22). During
90 development, *Rspo1* is required for ovarian differentiation and is down-regulated in the postnatal
91 ovary (23-25). In contrast, the expression of *Rspo2* has been detected in mice oocytes at birth and
92 heterozygous loss-of-function female mice gradually lose their fertility from four months of age
93 (22, 26, 27). The identification of the cause of this progressive sterility necessitated a detailed
94 analysis of the ovaries of *Rspo2* loss-of-function mouse model. Here we show that RSPO2 is a
95 critical factor involved in the communication between the oocyte and the granulosa cells. Indeed,
96 this oocyte-secreted factor induces activation of WNT/CTNNB1 signaling in the granulosa cells
97 allowing their proliferation and hence follicular growth. Consequently, lack of *Rspo2* in the ovary
98 or *Ctnnb1* in granulosa cells leads to blockage of the follicles at the primary stage.

99

100 **Results**

101 ***Rspo2* expression is restricted to the oocyte in postnatal ovaries**

102 To gain insight into the role of *Rspo2* in the ovary, we first characterized the expression pattern of
103 *Rspo2* in mouse ovaries. *In situ* hybridization experiments revealed that *Rspo2* is weakly
104 expressed in fetal ovaries. At birth (0 dpp-day *post-partum*), *Rspo2* expression is restricted to the
105 oocyte of primordial follicles (Fig.1A). *Rspo2* expression then increases in the oocyte of
106 developing follicles at 8 dpp and 21 dpp. Notably, granulosa cells are devoid of *Rspo2* expression
107 irrespective to the time-point considered. In a 12-month-old girl, immunolocalization of RSPO2
108 demonstrates that RSPO2 is also expressed within the oocyte of primordial, primary and preantral
109 follicles (Fig.S1A). This suggests that *RSPO2/Rspo2* is expressed in the oocyte as soon as the
110 primordial follicle stage both in humans and mice.

111

112 ***Rspo2* loss-of-function ovaries lack secondary follicles**

113 To investigate the function of *Rspo2* in postnatal ovaries, we used a loss-of-function *Rspo2* allele
114 created by a transgene insertional mutation (*Rspo2*^{Tg/Tg}) (28). Since the *Rspo2*^{Tg/Tg} pups die at

115 birth due to respiratory distress, we transplanted *Rspo2*^{Tg/Tg} and wildtype fetal ovaries (18.5 dpc-
116 day *post coitum*) under the kidney capsule of athymic female mice. At day 8-post transplantation
117 (8d), histological analyses revealed that both wildtype and *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries contain primordial
118 and primary follicles (Fig.1B, FigS1C). This indicates a developmental delay due to
119 transplantation since non-transplanted wildtype ovaries already harbor secondary follicles at 8
120 dpp (Fig.1A)(2). At 12d, wildtype transplanted ovaries contained 45% of secondary follicles
121 (Fig.S1C). At 21d, 36% of the wildtype follicles were tertiary follicles, as evidenced by multiple
122 granulosa cell layers (Fig.S1C). In addition, some follicles had reached the antral stage with the
123 formation of a fluid-filled antrum (Fig.1B). In contrast, in *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries, 62% of the follicles
124 were still at the primary stage with only one layer of nucleus-centered cuboidal granulosa cells
125 (Fig.1B, Fig.S1C). Moreover, some oocytes were surrounded by flattened somatic cells,
126 suggesting that they remained as primordial follicles or were developmentally blocked at the
127 transition from primordial to primary follicle. Others exhibited an asymmetric appearance, with
128 one layer of cells on one side and a disorganized multilayer of granulosa cells on the other side
129 (Fig. S1B). These abnormalities were not observed in wildtype ovaries. Corpora lutea resulting
130 from ovulation were apparent in 2-month-old wildtype transplanted ovaries whereas *Rspo2*^{Tg/Tg}
131 follicles remained blocked as primary follicles (Fig.1B). In conclusion, our data show that most
132 primary follicles cannot develop beyond early secondary follicles in the absence of *Rspo2*.

133

134 **Follicular cells lose granulosa cell identity in absence of RSPO2**

135 Previous data indicate that the transcription factor *Foxl2* is expressed in granulosa and theca cells
136 and is required for the transition from flattened to cuboidal granulosa cells (9, 29). In *Rspo2*^{Tg/Tg}
137 ovaries, FOXL2 immunolocalizations confirmed the identity of the granulosa cells (Fig.S2). A
138 subset of these cells also express AMH, a marker of granulosa cells in primary to antral follicles
139 (30) but the expression of AMH is sporadic with some cells expressing high levels and others low
140 levels of AMH in *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles at 12d. At 21d, most of the *Rspo2*^{Tg/Tg} granulosa cells fail to
141 express AMH but remain FOXL2-positive. Our data suggest that these granulosa cells do not
142 gain or keep the identity of granulosa cell of primary follicles. FOXL2 immunostainings also
143 revealed some positive stromal cells (31) in *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries. These cells were also positive for
144 SF1/NR5A1 indicating that *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries contain theca cells.

145

146 **Intercellular junctions are impaired in *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles**

147 Given that granulosa cells were disorganized in *Rspo2*^{Tg/Tg} primordial/primary follicles (Fig.S1B),
148 we investigated the establishment of the normal granulosa cell polarity. We first analyzed the
149 localization of Laminin (LAMA1), a major component of the basal lamina. Immunostainings for
150 LAMA1 did not reveal differences between the wildtype and the mutant follicles, indicating a
151 normal deposition of the basal lamina (Fig.2A). CDH2 (N-Cadherin), present in the adherens
152 junctions of granulosa cells, is robustly expressed from primary follicles onwards (32). In
153 *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles, CDH2 was less abundant especially at the interface between oocyte and
154 granulosa cells (Fig.2A,B). In addition, the tight junction protein TJP1 (ZO1) was found enriched
155 at the interface between oocyte and granulosa cells (apical TJP1) but also present at a lower level
156 between granulosa cells (lateral TJP1) of wildtype ovaries. Immunostainings and quantification
157 analyses highlighted that TJP1 is less expressed in *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles (Fig.2A,B). Altogether this
158 shows a defect of the establishment of adherens junctions between the follicular cells and tight
159 junctions at the apical pole of granulosa cells.

160

161 **Granulosa cells exhibit cell cycle progression defects in *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles**

162 The lack of secondary follicles suggested a defect in proliferation of the granulosa cells in
163 *Rspo2*^{Tg/Tg} females. We examined cell cycle progression using MKI67 that is expressed in all
164 active phases of the cell cycle (G1, S, G2, M) at 12d (Fig.3A). The number of MKI67-positive
165 granulosa cells was similar in wildtype and mutant ovaries, indicating that these cells are
166 proliferating. To evaluate the rate of cell cycle progression, we analyzed the G2/M transition by
167 quantification of the expression of *Ccnb1* (CyclinB1) and Phosphohistone H3 (PHH3) using
168 qRT-PCR and immunolocalization respectively (Fig.3A,B). No difference was observed in the
169 level of *Ccnb1* transcripts but the percentage of PHH3-positive granulosa cells was decreased in
170 *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries in comparison with wildtypes. These observations indicate that fewer
171 granulosa cells attain the G2/M transition phase of the cell cycle in *Rspo2*^{Tg/Tg} females. *Ccnd1*, a
172 cyclin involved in G1 phase progression was down-regulated in the *Rspo2*^{Tg/Tg} ovary. *Cdkn1a* and
173 *Cdkn1b* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1a-b also denoted p21 and p27 respectively), two

174 proteins that mediate cell cycle arrest were trending to be upregulated at 8d and were confirmed
175 to be upregulated by 12d (Fig.3B). In addition, immunolocalization of CDKN1B show an
176 increase of CDKN1B-positive granulosa cells in *Rspo2^{Tg/Tg}* females at this stage (Fig.3A).
177 Altogether, our data indicate that the progression of the granulosa cell cycle is impaired, giving
178 an explanation for the blockage of follicular growth observed in *Rspo2^{Tg/Tg}* ovaries. Thus, oocyte-
179 specific RSPO2 appears to be an enhancer of cell cycle progression of granulosa cells during
180 follicular growth.

181

182 **Oocyte growth is independent of RSPO2 signaling**

183 Whereas growth of the granulosa cells is impaired, the oocytes appear to have a similar size in
184 wildtype and *Rspo2^{Tg/Tg}* ovaries at 21d (Fig.1B, S1B). Before carrying out quantifications, we
185 evaluated the impact of transplantation on follicular growth by comparing the oocyte and the
186 follicular diameters in non-transplanted and transplanted wildtype ovaries at 21dpp and 21d
187 (Fig.S3). This shows that the diameter of the oocyte increases regularly during follicle growth in
188 both conditions (a 3-fold increase from 20 to 60µm in tertiary/antral follicles). There is however a
189 noticeable difference in the size of antral follicles displaying an average diameter of 250 µm for
190 non-transplanted ovaries and 170 µm for transplanted ovaries. This reflects that the fluid-filled
191 cavity enlargement of antral follicles is less advanced in transplanted ovaries (Fig.1B). However,
192 our results demonstrate that transplantation does not hamper oocyte and follicle growth.

193 Next, we compared the size of oocytes in wildtype and *Rspo2^{Tg/Tg}* follicles. At 21d, primordial,
194 primary, secondary and tertiary/antral follicles constitute 1%, 4%, 33% and 62% of all wildtype
195 follicles, respectively (Fig.4A). On average, the oocyte diameter increases from 20µm in
196 primordial to 30µm in primary and 56µm in secondary in wildtype follicles. In *Rspo2^{Tg/Tg}*
197 ovaries, primary follicles contain oocytes of 55µm in diameter, corresponding to the diameter of
198 oocytes of secondary wildtype follicles (Fig.4A). In addition, 11% of the follicles are abnormal
199 primordial follicles surrounded by a layer of flattened granulosa cells, with oocytes of 63µm in
200 diameter, corresponding to the size of the oocyte in tertiary/antral wildtype follicles. At 21d, 82%
201 of the follicles are primordial and primary follicles in *Rspo2^{Tg/Tg}* ovaries. Our data demonstrate
202 that *Rspo2* ablation does not impair oocyte growth despite the growth arrest of the primary
203 follicles.

204

205 **Oocyte-secreted RSPO2 activates WNT/CTNNB1 signaling in granulosa cells**

206 The phenotype of *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries shows similarities with *Gdf9*^{-/-} ovaries regarding the lack of
207 granulosa cell proliferation and the maintenance of the oocyte growth (13, 14). This prompted us
208 to investigate the expression level of key genes involved in GDF9 signaling like *Gdf9* and its
209 receptors *Bmpr2* and *Alk4* (33) by qRT-PCR analyses. None of these transcripts were down-
210 regulated, suggesting that RSPO2 signaling acts independently of the GDF9 pathway (Fig.4B). In
211 addition, we analyzed the expression of *Kit* and *KitL*, two factors involved in primordial follicle
212 activation (34). *Kit* expression was similar in wildtype and mutant ovaries, indicating the
213 maintenance of this signaling pathway from the oocyte towards granulosa cells. The expression
214 of *KitL* was lowered in *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries at 12d, but the expression of the granulosa cell marker
215 *Foxl2* was also reduced, suggesting that *KitL* reduction is associated with the diminution of the
216 granulosa cell numbers.

217 RSPO2 is an activator of WNT/CTNNB1 signaling that induces the expression of different genes
218 including *Axin2*, a universal readout of the activation of this signaling pathway (35). *In situ*
219 hybridization revealed that *Axin2* is highly expressed in the oocyte and weaker in granulosa cells
220 in wildtype ovaries at 12d (Fig.4C). In *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles, the expression of *Axin2* is restricted to
221 the oocytes. Quantification of the signal intensity confirmed the down-regulation of *Axin2* in
222 granulosa cells as evidenced by a robust decrease of *Axin2* mRNA in these cells (Fig.4D). Thus,
223 RSPO2 activates WNT/CTNNB1 signaling in granulosa cells.

224

225 **WNT/CTNNB1 signaling is required for granulosa cell proliferation**

226 To assess the contribution of WNT/CTNNB1 signaling in granulosa cell proliferation,
227 conditional deletion of *Ctnnb1* was performed by using *Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl} mice. *Wt1Cre*^{ERT2}
228 is driven by the endogenous *Wt1* promoter and is expressed in granulosa cells (36). Genetic
229 deletion was induced by tamoxifen administration at 3 and 4 dpp and analyses were performed at
230 12 and 21 dpp (Fig.5A). At both stages, mutant ovaries lack secondary follicles (Fig.5B), as
231 previously observed in *Rspo2*^{Tg/Tg} transplanted ovaries (Fig.1B). Since the active nuclear form of
232 CTNNB1 is not always apparent in ovaries (32), we verified the down-regulation of *Ctnnb1* by

233 *Axin2* *in situ* hybridization experiments at 21 *dpp* and observed that *Axin2* expression is reduced
234 in *Wt1Cre^{ERT2}; Ctnnb1^{fl/fl}* granulosa cells in comparison with *Ctnnb1^{fl/fl}* ovaries (Fig.S4A).
235 Further, the adherens and tight junction markers CDH2 and TJP1 respectively are less abundant
236 in *Wt1Cre^{ERT2}; Ctnnb1^{fl/fl}* follicles than in *Ctnnb1^{fl/fl}* follicles at 12 *dpp* (Fig.5C). This suggests
237 that granulosa cells are not tight enough to allow the formation of adherens and tight junctions in
238 ovaries lacking *Ctnnb1*.

239 We then characterized the proliferative status of the granulosa cells. QRT-PCR experiments
240 revealed that the direct target of CTNNB1, *Ccnd1*, is down-regulated in mutant ovaries whereas
241 the two cell cycle inhibitors *Cdkn1a* and *Cdkn1b* are up-regulated (Fig.5E). Moreover,
242 immunolocalization of CDKN1B showed an up-regulation of this marker in granulosa cells in
243 mutant ovaries (Fig.5D), highlighting an arrest in the G1 phase of the cell cycle, as evidenced in
244 *Rspo2^{Tg/Tg}* ovaries (Fig.3B). QRT-PCR analysis indicated an absence of significant modification
245 of the expression of *Gdf9* and its receptors *Bmpr2* and *Alk4* (Fig.S4B). In contrast, *KitL*
246 expression was decreased at 8 and 12 *dpp* whereas oocyte-specific *Kit* expression was maintained
247 in the *Wt1Cre^{ERT2}; Ctnnb1^{fl/fl}* ovaries (Fig.S4B). In summary, conditional deletion of *Ctnnb1*
248 within the granulosa cells of primordial follicles impaired their proliferation and prevented
249 follicular growth beyond the primary follicular stage in a GDF9 signaling independent manner.
250 Given that this phenotype recapitulates the phenotype induced by *Rspo2* ablation, our data
251 confirm that RSPO2 is an enhancer of WNT/CTNNB1 signaling in granulosa cells. Remarkably,
252 our data show that RSPO2/CTNNB1 is mediated by juxtacrine signaling with the oocyte-secreted
253 RSPO2 promoting CTNNB1 activation in the neighboring granulosa cells.

254

255 **Discussion**

256 In the ovary, the regulation of *Rspo2* expression is attributed to the oocyte-specific homeobox
257 gene, *Nobox* as evidenced by microarray analysis of *Nobox* loss-of-function ovaries showing a
258 down-regulation of *Rspo2* (37) and by *in silico* analysis of the *Rspo2* promoter revealing the
259 presence of two NOBOX binding elements (38). However, the ablation of *Nobox* triggers rapid
260 degeneration of perinatal oocytes, thus impacting the expression of many oocyte-specific genes
261 like *Rspo2* (39). The expression of *RSPO2* has also been shown to be regulated by the
262 transcription factor FOXL2 in goat ovaries (40). In mouse, FOXL2 cannot directly regulate

263 *Rspo2* given that *Rspo2* is expressed in the oocyte and *Foxl2* in granulosa cells. Thus, regulation
264 of *Rspo2* expression in the postnatal oocyte remains to be investigated.

265

266 Our study exemplifies the importance of the communication between the oocyte and the
267 neighboring granulosa cells. Here we show that the oocyte factor RSPO2 induces the activation
268 of WNT/CTNNB1 signaling, also called canonical WNT signaling, in granulosa cells, thereby
269 promoting cell cycle progression and eventually follicular growth (Fig.6). Consequently, ablation
270 of *Rspo2* leads to a lack of growing numbers of granulosa cells that are required to develop
271 secondary follicles and follicles remain at the primary stage. This arrest is associated with a
272 disruption of the identity of the granulosa cells when they age as evidenced by down-regulation
273 of AMH. Remarkably, this does not trigger follicular degeneration since primary follicles are still
274 observed in 2-month-old *Rspo2^{Tg/Tg}* ovaries. Thus, these follicles unlikely gain the competency to
275 become atretic as previously reported in *Gdf9^{-/-}* ovaries (13). Overall, our results demonstrate that
276 RSPO2 is an oocyte-secreted mitogen required for granulosa cell proliferation and eventually
277 differentiation.

278

279 In *Foxl2* loss-of-function mice, granulosa cells hardly proliferate and this results from their
280 inability to become cuboidal cells (9). In agreement with this, previous results showed that the
281 change in shape from flattened to cuboidal granulosa cells is associated with an increase in
282 proliferation (8, 41). How the change of shape and proliferation are related is unknown. Although
283 RSPO2 signaling promotes granulosa cell proliferation, it does not seem to be involved in early
284 remodeling of granulosa cells. Indeed, KIT signaling is not impaired at an earlier stage like 8d,
285 suggesting that activation of the primordial follicles is maintained as previously described by (4).
286 Moreover, most of the granulosa cells were not flattened or squamous from 8d ovaries but
287 became cuboidal in *Rspo2^{Tg/Tg}* follicles. The granulosa cells were disorganized, rarely evolved
288 into dense polarized columnar cells, and exhibited less abundant adherens and tight junctions in
289 comparison with wildtypes. To explain why there are fewer junctions would necessitate further
290 investigations. This could be directly linked to the lack of expression of these adhesion proteins
291 or it could be the result of a lack of physical constraint. It is likely that the lower number of
292 granulosa cells prevents them from forming a layer of packed contiguous cells and the
293 insufficiency of contacts between these cells might hinder the formation of junctions in

294 *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles. Interestingly, it has been shown that the elimination of protein
295 geranylgeranylation, involved in post-translational modifications of proteins impairs cell
296 adhesion between the oocyte and the granulosa cells and promotes the arrest at the primary-
297 secondary follicle transition (42). Thus, the decrease of tight and adherens junctions in *Rspo2*^{Tg/Tg}
298 and *Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl} ovaries might contribute to the blockage of growth of primary
299 follicles.

300
301 The oocyte factor GDF9 plays a central role in the signaling from the oocyte to the somatic cells
302 (6). Strikingly, GDF9 and RSPO2 signaling are both involved in granulosa cell proliferation.
303 RSPO2 activates WNT/CTNNB1 signaling and GDF9 signaling acts through the BMP2/ALK4
304 heterodimer receptor and SMAD2/3 pathway in the granulosa cells (33). Recently, GDF9 was
305 also reported to promote the formation of the transzonal projections from the neighboring
306 granulosa cells to the oocyte through the zona pellucida (12). The mechanism of action of R-
307 spondin is still not very well understood but RSPOs might use filopodia to reach their target cells
308 as has been shown for WNT ligands (43). The lack of filopodia in *Gdf9*^{-/-} follicles may prevent
309 the delivery of RSPO2 to the granulosa cells once the zona pellucida is formed, thus preventing
310 the follicular growth. GDF9 might therefore promote RSPO2/WNT signaling in the ovarian
311 follicle.

312 Considering the fertility defect in heterozygous *Rspo2* mutant mice, the severe follicular growth
313 defect in *Rspo2* homozygous mutant ovaries and the conservation of RSPO2 expression in
314 ovaries in a little girl, we can assume that *RSPO2* is a candidate gene for premature ovarian
315 insufficiency (POI) in women. Bouilly et al (38) previously screened 100 patients suffering from
316 POI and did not associate RSPO2 as a potential cause. This might be due to the heterozygous
317 condition. Indeed, homozygous mutations of RSPO2 have been described in human patients with
318 a rare malformation disorder, the Tetra-Amelia and Lung Hypo/Aplasia Syndrome characterized
319 by absence of the four limbs and pulmonary anomalies (44, 45). The patients die at birth due to
320 respiratory distress but in most cases, ultrasonography evaluation leads to an early termination of
321 the pregnancy. Few cases have been described and the pathological examination of one female
322 fetus at the 22th gw (gestational weeks) excluded genito-urinary anomalies but there is no detail
323 on folliculogenesis (46). At this age, primary follicles are present, but secondary follicles are still

324 rare, thus preventing to know whether loss of *RSPO2* could induce a follicular growth defect in
325 these patients. Given the severity of the phenotype described here, the different actors involved in
326 *RSPO2*/WNT signaling in the ovary, once identified, will likely become new candidates for
327 premature ovarian insufficiency.

328

329 **Material and Methods**

330 **Mouse strains and genotyping**

331 The experiments were carried out in compliance with the relevant institutional and French animal
332 welfare laws, guidelines and policies and have been approved by the French ethics committees
333 (CIEPAL, accreditation APAFIS#4035-2016012712367693). The mice were kept on a mixed
334 129/C57Bl6/J genetic background. The mice were bred as heterozygous for the *footless* mutation,
335 a loss-of-function mutation of *Rspo2* previously described in (26, 28). Homozygous mutant
336 *Rspo2*^{Tg/Tg} embryos were identified by limb malformations and hypoplasia and confirmed by
337 genotyping as previously described in (26, 28). Homozygous females carrying the *Ctnnb1*^{fl} allele
338 were mated with *Wt1Cre*^{ERT2} males to generate *Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl} mice (47, 48). Activation
339 of the Cre recombinase was performed by intraperitoneal injections of 0.4 mg of tamoxifen
340 (Sigma-Aldrich) dissolved in corn oil (Sigma-Aldrich) per pup.

341

342 **Transplantation of fetal mouse ovaries**

343 Wildtype and *Rspo2*^{Tg/Tg} embryos were collected from 18.5 dpc fetuses. Ovaries were dissected
344 out and transplanted under the kidney capsule of 6-week-old female athymic mice (Envigo,
345 France). Transplants were dissected from host animals 8, 12, 21 days or 2 months post-
346 transplantation and processed as described below.

347

348 **Histological analysis**

349 Kidneys including the transplants or ovaries were dissected, fixed in Bouin's solution overnight
350 embedded in paraffin, sectioned at 5 µm thickness and stained with hematoxylin and eosin (HE).
351 Pictures were taken with an Axioscope 2 (Zeiss) or MZ9.5 (Leica) microscope coupled with an
352 AxioCAM MRc5 (Zeiss) or DHC490 (Leica) camera and Axiovision 4.8 (Zeiss) or application
353 suite V3.3.0 (Leica) software, and processed with Adobe Photoshop for mosaics and Fiji (49).

354

355 **Morphometric analyses of ovarian follicles**

356 The developmental stages of ovarian follicles (primordial, primary, secondary, tertiary and antral)
357 were determined on HE stained Bouin's fixed sections, on the basis of the standards established
358 by (50). Follicles were counted in 10 randomly selected sections of 3 wildtype and mutant grafted
359 ovaries and expressed as a percentage of the total number of follicles counted. The average
360 oocyte and follicle diameters were evaluated as performed by (34). Only the follicles sectioned
361 through the nucleus of the oocyte were scored.

362

363 ***In situ* hybridization analyses**

364 Samples were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at room temperature. Five μm
365 sections were processed for RNA *in situ* detection using the RNAscope 2.0 High Definition-RED
366 Kit according to the manufacturer's instructions (ACDBio, (51)) using the Fast Red dye. *Axin2*
367 and *Rspo2* probes were designed by ACDBio. For *Axin2* detection, slides were counterstained
368 with DAPI diluted in the mounting medium at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Vectashield, Vector laboratories) to
369 detect nuclei. RNAscope results were examined under a confocal microscope Leica DM5500
370 TCS SPE on an upright stand (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), using an ACS APO
371 63X oil 1.3 NA objective. The lasers used were diodes laser (405 nm, 488 nm, 532 nm and 635
372 nm). The microscope was equipped with a galvanometric stage in order to do z-acquisitions. For
373 *Rspo2* detection, slides were counterstained with 50% Hematoxylin for 10s and incubated in
374 0.1% sodium bicarbonate for 1min. Slides were then mounted in VectaMount AQ medium
375 (Vector Lab), scanned with Vectra Polaris Automated Imaging System and examined with
376 Phenochart Software (PerkinElmer).

377

378 **Immunolabeling analyses**

379 Mouse samples were fixed in 4% PFA overnight at 4°C and then processed for paraffin
380 embedding. Microtome sections of 6 μm thickness were processed for immunostaining, and
381 antigens were retrieved in Envision Flex Target Retrieval solution (pH9) on the PTlink Pre
382 Treatment Module (DAKO, Agilent). The following dilutions of primary antibodies were used:
383 AMH (C-20, sc6886, Santa Cruz) 1:200, CDH2 (cat 33-3900, Invitrogen) 1:200, FOXL2
384 (NB100-1277, Novus Bio) 1:400, LAMA1 (cat L9393, Sigma) 1:150, MKi67 (clone SP6, cat

385 9106, Thermo-Scientific) 1:200, p27 (sc-528, Santa Cruz) 1:200, PHH3 (ab14955, Abcam)
386 1:300, SF1 (kindly provided by Prof.Morohashi) 1:1000, TJP1 (cat 40-2300, Invitrogen) 1:200.
387 Slides were counterstained with DAPI diluted in the mounting medium (Vectashield, Vector
388 laboratories). Imaging was performed with a motorized Axio ImagerZ1 microscope (Zeiss)
389 coupled with an Axiocam Mrm camera (Zeiss) and processed with Axiovision LE (Zeiss) or on a
390 LSM 780 NLO inverted Axio Observer.Z1 confocal microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH,
391 Jena,Germany) using a C-Apo 40X water 1.2 NA objective when quantification was needed.
392 Images were acquired in mono-photon mode using a LASER diode 405 nm and/or Argon
393 LASER (458, 488, 514 nm) nm and/or DPSS 561 nm and/or HeNe 633 nm. Fluorescence
394 emission was detected on a descanned spectral GaAsp PMT 32 channels. The microscope z-drive
395 was used for z acquisitions.

396 Formalin-fixed paraffin-embedded ovaries from girls aged 12 postnatal months dying suddenly
397 and unexpectedly were accrued under the French autopsy law that allows the use of such tissues
398 for in-depth anatomopathological examination (Law 94-654 published on 29 July 1994). Autopsy
399 was performed with informed consent of the parents in all cases. These methods were carried out
400 in accordance with relevant guidelines and regulations. All the experiments and experimental
401 protocols on human subjects were approved by the institutional committee of the French agency
402 for biomedical research (Agence de la Biomédecine, Saint-Denis la Plaine, France).
403 Immunohistochemistry was performed as previously described (François et al, Scientific report
404 2017). Slides were incubated overnight with primary antibodies for RSPO2 (Dilution 1/100;
405 Sigma, HPA024764). They were counterstained in hematoxylin, dehydrated and mounted in
406 Eukitt (Sigma).

407

408 **Image post-treatments and quantitative analyses**

409 Images were assembled using the open source software platform OMERO
410 (<https://www.openmicroscopy.org/omero/>). Post-treatment image acquisition and analysis were
411 performed on Fiji (49), using a homemade semi-automated macro when needed.

412 ***Axin2* expression:** Z-stack images were processed through sum slices projection and gaussian
413 blur to determine oocyte Region Of Interest (ROI) and oocyte surface (μm^2). *Axin2* signal
414 intensity within the oocyte ROI was quantified as Raw Integrated Density after threshold
415 adjustment. Granulosa cell layer area was determined as the whole follicle area (drawn manually)

416 minus the oocyte ROI. *Axin2* signal intensity within the granulosa cell ROI was quantified as
417 Raw Integrated Density using the same threshold value as the one determined for the oocyte ROI.
418 **CDH2 signal intensity:** Z-stack images were processed through average intensity projection and
419 granulosa cell layer ROI was determined as the whole follicle area (drawn manually) minus the
420 oocyte surface (external contour of the oocyte drawn manually). CDH2 signal intensity within the
421 granulosa cell ROI was quantified as Raw Integrated Density after threshold adjustment
422 normalized on granulosa cell surface (μm^2).

423 **ZO1 signal intensity:** Z-stack images were processed through sum slices projection and gaussian
424 blur. Immunostaining of Zona Pellucida (ZP1) as a co-marker was used to identify the oocyte-
425 granulosa cell interface ROI. Apical ZO1 signal intensity, defined as the signal localized within
426 the ZP1 ROI, was quantified as Raw Integrated Density after threshold adjustment normalized on
427 ZP1 surface (μm^2). Granulosa cell layer ROI was determined as the whole follicle area (drawn
428 manually) minus the ZP1 ROI. ZO1 signal intensity was quantified within the granulosa cell ROI
429 as Raw Integrated Density, using the same threshold value than the one determined for the ZP1
430 ROI, normalized on granulosa cell surface (μm^2).

431 **Cell proliferation:** MKI67, PHH3, and CDKN1B counting was assessed manually on at least 10
432 different follicles per genotype by counting positive cells for each marker among total granulosa
433 cells of the follicle counted with DAPI.

434

435 **Quantitative PCR analysis**

436 RNA from snap frozen ovaries was extracted using the RNeasy Micro Kit (Qiagen) and reverse
437 transcribed using the RNA RT-PCR kit (Promega). Primers (Fig.S5) were designed by Roche
438 Assay Design Center (<http://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>). All Real-Time PCR assays
439 were carried out using LightCycler 480 SYBR Green Master kit (Roche). QRT-PCR were
440 performed on cDNA from one gonad and compared to a standard curve. Relative expression
441 levels of each gene were determined in the same run and normalized on the levels of endogenous
442 *Sdha* cDNA. QPCR were repeated in duplicate on cDNA issued from 3 ovaries of each genotype.

443

444 **Statistical analysis**

445 Values are depicted as mean \pm SEM except for cell proliferation counting, shown as box-and-
446 whisker plot representation to illustrate positive granulosa cell dispersion according to the follicle

447 considered. All the data were analyzed by unpaired two-sided Student's *t* test using Microsoft
448 Excel. Asterisks highlight the pertinent comparisons and indicate levels of significance: **p*< 0.05,
449 ***p*< 0.01 and ****p*< 0.001.

450

451 **Acknowledgments**

452 We are grateful to Isabelle Gillot and Aitana Perea-Gomez for helpful discussions. We thank the
453 services of the iBV, especially the animal facility members for their help in breeding mice and
454 Cécile Passot and Mireille Cutajar-Bossert for the management of funding. We also thank Samah
455 Rekima and the Experimental Histopathology Platform for assistance and histological sample
456 processing. The microscopy analyses were carried out at the PRISM iBV imaging platform. This
457 work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0028-01; ANR-
458 18-CE14-0012) and Ligue Nationale Contre le cancer (M.L.R. fellowship).

459

460 **References**

- 461 1. Edson MA, Nagaraja AK, & Matzuk MM (2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr*
462 *Rev* 30(6):624-712.
- 463 2. Pelosi E, Forabosco A, & Schlessinger D (2015) Genetics of the ovarian reserve. *Frontiers in genetics*
464 6:308.
- 465 3. Lei L & Spradling AC (2013) Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using
466 stable primordial follicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(21):8585-8590.
- 467 4. Zhang H, *et al.* (2014) Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of
468 dormant oocytes in mice. *Curr Biol* 24(21):2501-2508.
- 469 5. Jones RL & Pepling ME (2013) KIT signaling regulates primordial follicle formation in the neonatal mouse
470 ovary. *Dev Biol* 382(1):186-197.
- 471 6. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, & Eppig JJ (2002) Intercellular communication in the mammalian
472 ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296(5576):2178-2180.
- 473 7. Hirshfield AN (1989) Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-
474 term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 41(2):309-316.
- 475 8. Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, & Fortune JE (1997) Initiation of growth of baboon
476 primordial follicles in vitro. *Hum Reprod* 12(9):1993-2001.
- 477 9. Schmidt D, *et al.* (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell
478 differentiation and ovary maintenance. *Development* 131(4):933-942.
- 479 10. Da Silva-Buttkus P, *et al.* (2008) Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and
480 formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *J Cell Sci* 121(Pt 23):3890-
481 3900.
- 482 11. Wassarman PM & Litscher ES (2018) The Mouse Egg's Zona Pellucida. *Current topics in developmental*
483 *biology* 130:331-356.
- 484 12. El-Hayek S, Yang Q, Abbassi L, FitzHarris G, & Clarke HJ (2018) Mammalian Oocytes Locally Remodel
485 Follicular Architecture to Provide the Foundation for Germline-Soma Communication. *Curr Biol*
486 28(7):1124-1131 e1123.
- 487 13. Dong J, *et al.* (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.
488 *Nature* 383(6600):531-535.
- 489 14. Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, & Albertini DF (1998) Characterization of oocyte and follicle

- 490 development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 204(2):373-384.
- 491 15. Kazanskaya O, *et al.* (2004) R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is
492 required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* 7(4):525-534.
- 493 16. Nam JS, Turcotte TJ, Smith PF, Choi S, & Yoon JK (2006) Mouse cristin/R-spondin family proteins are
494 novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J*
495 *Biol Chem* 281(19):13247-13257.
- 496 17. Niehrs C & Acebron SP (2012) Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *Embo J* 31(12):2705-2713.
- 497 18. Tetsu O & McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.
498 *Nature* 398(6726):422-426.
- 499 19. Shtutman M, *et al.* (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl*
500 *Acad Sci U S A* 96(10):5522-5527.
- 501 20. He TC, *et al.* (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281(5382):1509-
502 1512.
- 503 21. Kim KA, *et al.* (2005) Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*
504 309(5738):1256-1259.
- 505 22. Cheng Y, *et al.* (2013) Oocyte-derived R-spondin2 promotes ovarian follicle development. *FASEB J*
506 27(6):2175-2184.
- 507 23. Parma P, *et al.* (2006) R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat*
508 *Genet* 38(11):1304-1309.
- 509 24. Chassot AA, *et al.* (2008) Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the
510 mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 17(9):1264-1277.
- 511 25. De Cian MC, *et al.* (2017) Amplification of R-spondin1 signaling induces granulosa cell fate defects and
512 cancers in mouse adult ovary. *Oncogene* 36(2):208-218.
- 513 26. Bell SM, Schreiner CM, Hess KA, Anderson KP, & Scott WJ (2003) Asymmetric limb malformations in a
514 new transgene insertional mutant, footless. *Mech Dev* 120(5):597-605.
- 515 27. Nam JS, *et al.* (2007) Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the
516 hindlimb. *Dev Biol* 311(1):124-135.
- 517 28. Bell SM, *et al.* (2008) R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis.
518 *Development* 135(6):1049-1058.
- 519 29. Uhlenhaut NH, *et al.* (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*
520 139(6):1130-1142.
- 521 30. Munsterberg A & Lovell-Badge R (1991) Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a
522 role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113(2):613-624.
- 523 31. Ikeda Y, *et al.* (1993) Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid
524 hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 7(7):852-860.
- 525 32. Mora JM, *et al.* (2012) Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse
526 ovarian follicles. *Biol Reprod* 86(5):153, 151-114.
- 527 33. Peng J, *et al.* (2013) Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent
528 regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(8):E776-785.
- 529 34. Saatcioglu HD, Cuevas I, & Castrillon DH (2016) Control of Oocyte Reawakening by Kit. *PLoS Genet*
530 12(8):e1006215.
- 531 35. Lustig B, *et al.* (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in
532 colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 22(4):1184-1193.
- 533 36. Pelletier J, *et al.* (1991) Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes*
534 *Dev* 5(8):1345-1356.
- 535 37. Choi Y, *et al.* (2007) Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking Nobox. *Biol Reprod*
536 77(2):312-319.
- 537 38. Bouilly J, *et al.* (2017) R-spondin2, a novel target of NOBOX: identification of variants in a cohort of
538 women with primary ovarian insufficiency. *J Ovarian Res* 10(1):51.
- 539 39. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, & Matzuk MM (2004) NOBOX deficiency disrupts early
540 folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305(5687):1157-1159.
- 541 40. Kocer A, *et al.* (2008) R-spondin1 and FOXL2 act into two distinct cellular types during goat ovarian
542 differentiation. *BMC Dev Biol* 8:36.
- 543 41. Meredith S, Dudenhoefter G, & Jackson K (2000) Classification of small type B/C follicles as primordial
544 follicles in mature rats. *J Reprod Fertil* 119(1):43-48.

- 545 42. Jiang C, *et al.* (2017) GGPP-Mediated Protein Geranylgeranylation in Oocyte Is Essential for the
546 Establishment of Oocyte-Granulosa Cell Communication and Primary-Secondary Follicle Transition in
547 Mouse Ovary. *PLoS Genet* 13(1):e1006535.
- 548 43. Stanganello E, *et al.* (2015) Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning. *Nature*
549 *communications* 6:5846.
- 550 44. Basaran S, *et al.* (1994) Tetra-amelia, lung hypo-/aplasia, cleft lip-palate, and heart defect: a new
551 syndrome? *Am J Med Genet* 51(1):77-80.
- 552 45. Szenker-Ravi E, *et al.* (2018) RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development
553 independently of LGR4/5/6. *Nature* 557(7706):564-569.
- 554 46. Sousa SB, *et al.* (2008) Tetra-amelia and lung hypo/aplasia syndrome: new case report and review. *Am J*
555 *Med Genet A* 146A(21):2799-2803.
- 556 47. Brault V, *et al.* (2001) Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in
557 dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* 128(8):1253-1264.
- 558 48. Zhou B, *et al.* (2008) Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing
559 heart. *Nature* 454(7200):109-113.
- 560 49. Schindelin J, *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*
561 9(7):676-682.
- 562 50. Pedersen T & Peters H (1968) Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J*
563 *Reprod Fertil* 17(3):555-557.
- 564 51. Wang F, *et al.* (2012) RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-
565 embedded tissues. *J Mol Diagn* 14(1):22-29.
- 566

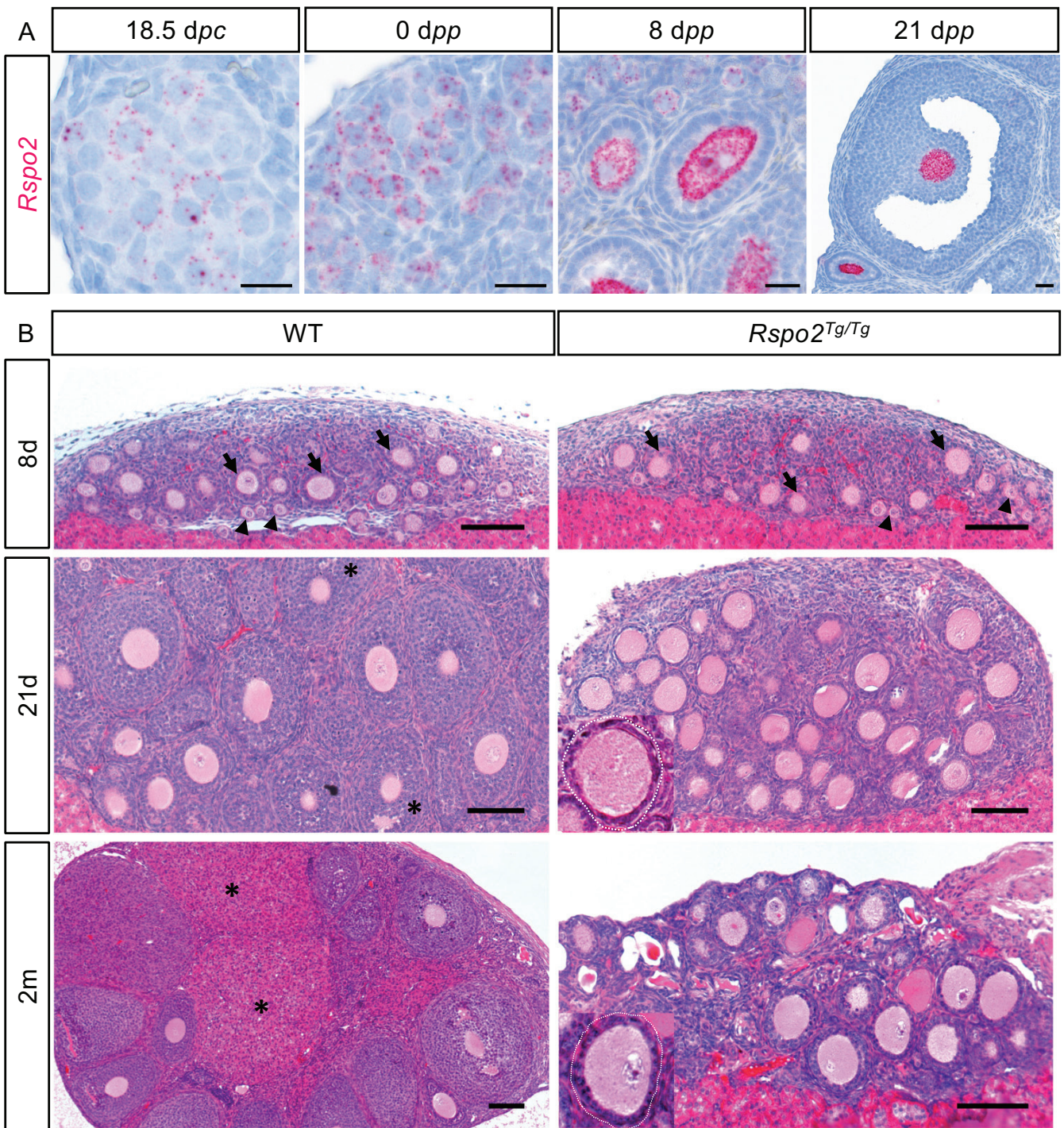


Figure 1. RSPO2 is required for follicular growth

(A) *Rspo2* *in situ* hybridization analyses at 18.5 *dpc* and 0, 8 and 21 *dpp* show *Rspo2* expression in oocytes after birth in mouse ovaries. Scale bar, 20 μ m. (B) Histological analyses (HE staining) of wildtype (WT) and *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries at 8 and 21 post-transplantation days (8d, 21d) and 2 months (2m) of 18.5 *dpc* ovaries. WT and *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries contain primordial (arrowheads) and primary (arrows) follicles at 8d. At 21d, *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries lack secondary, tertiary and antral (*) follicles whereas WT ovaries contain these different types of follicles. After 2 months, corpora lutea (*) are observed in WT ovaries. In contrast, follicles remain blocked at the primary-secondary transition in *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries. Follicles are outlined with a white dotted line. Scale bars, 100 μ m.

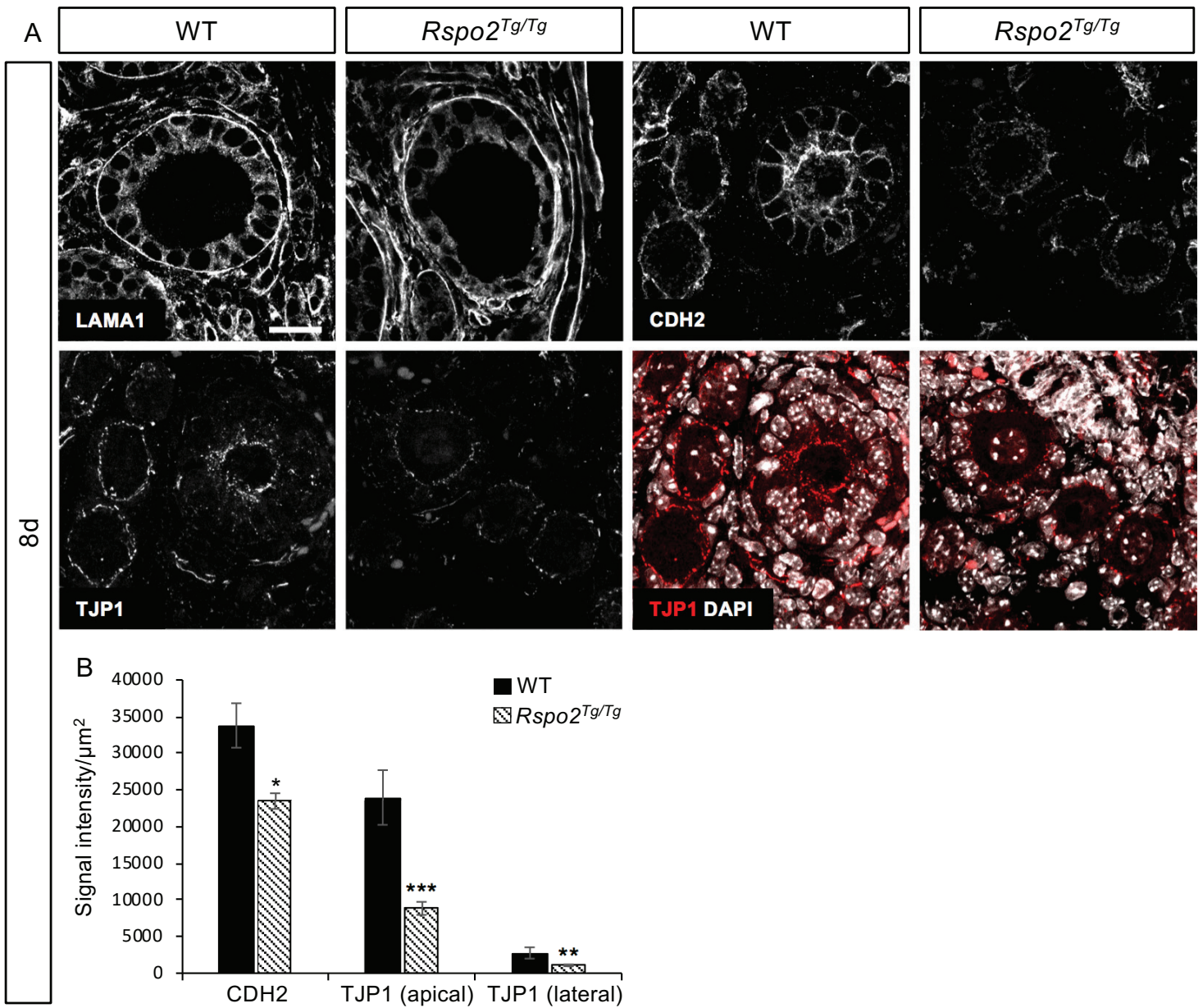


Figure 2. Granulosa cell intercellular junctions are less abundant in *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles

(A) Immunodetection of LAMA1 (basal lamina), CDH2 (adherens junctions) and TJP1 (tight junctions) at 8d in WT and *Rspo2*^{Tg/Tg} transplanted ovaries. Follicles are surrounded by a continuous basal lamina in both genotypes as evidenced by LAMA1 immunostainings. CDH2 and TJP1 signals are decreased, notably at the interface between the oocyte and granulosa cells, indicating a deficit of cohesion in *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles. Scale bar, 20µm. (B) This result is corroborated by quantitative analysis of CDH2 and TJP1 signal intensity on confocal sections. Data are presented as mean ± SEM. n=5 WT and n=9 *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles from 1 transplanted ovary of each genotype. Student's *t* test, unpaired two-sided (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

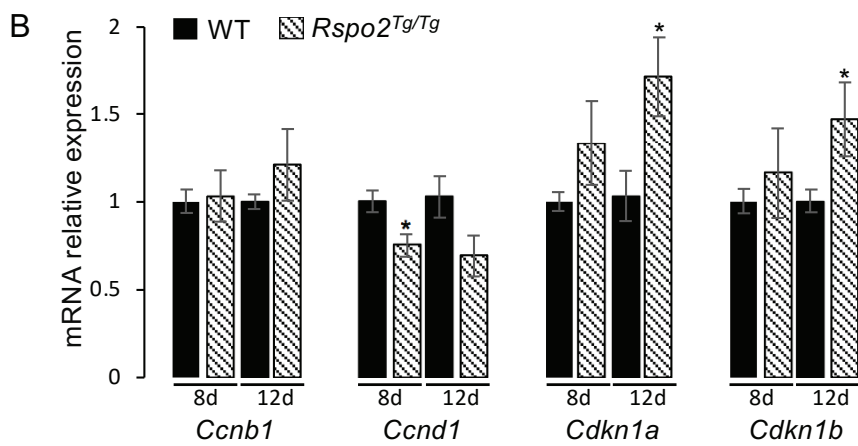
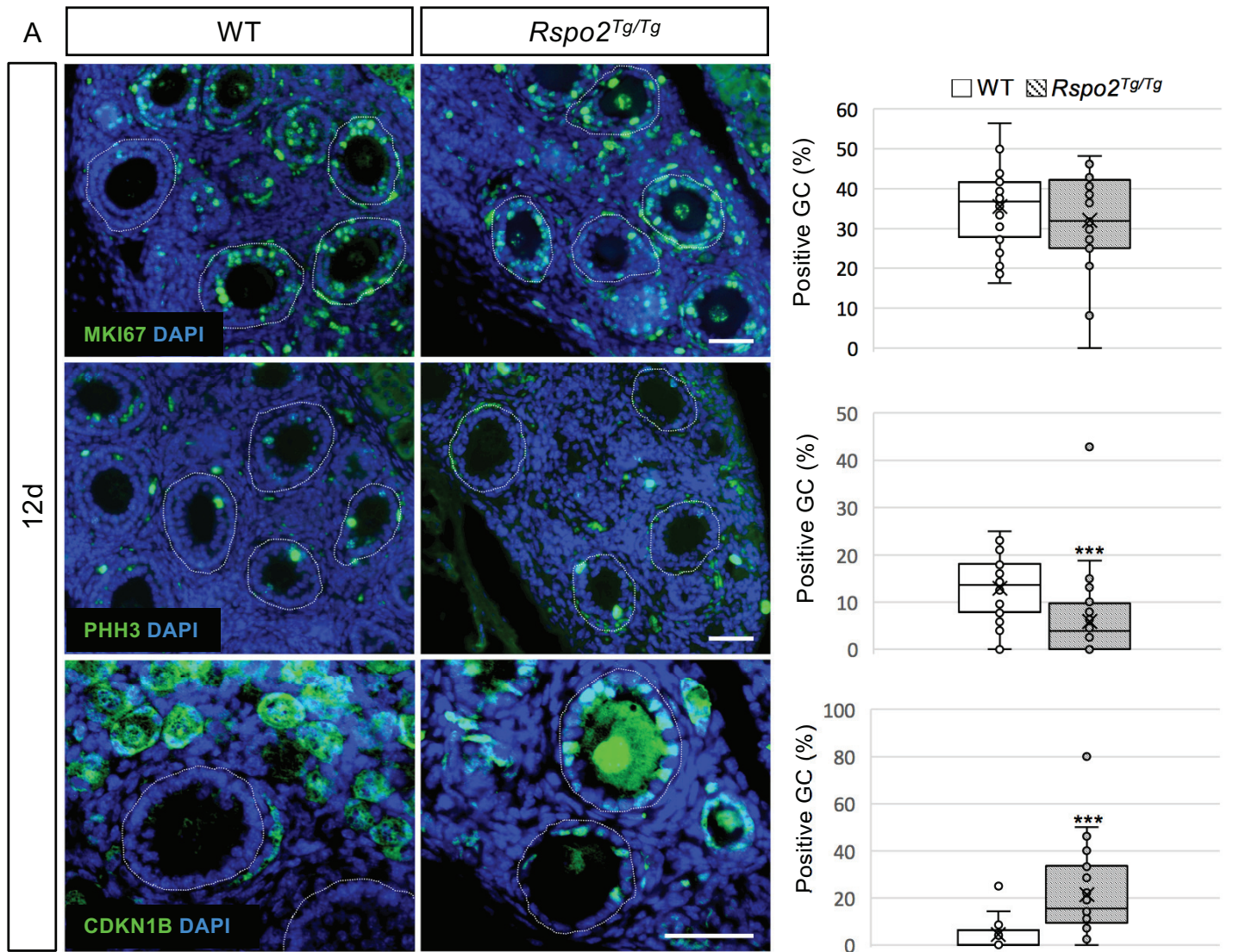


Figure 3. Granulosa cell cycle progression is impaired in absence of RSPO2

(A) Immunodetection and quantitative analyses of MKI67, PHH3 and CDKN1B (p27) to assess the proliferation status of granulosa cells at 12d in WT and *Rspo2*^{Tg/Tg} transplanted ovaries. Left panel: follicular cells are engaged in cell cycle as indicated by MKI67 immunostaining but exhibit an interphase delay illustrated by a decrease of PHH3-positive and an increase of CDKN1B-positive granulosa cells in mutant ovaries. Follicles are outlined with a white dotted line. Right panel: quantification of the % of positive granulosa cells for MKI67, PHH3 and CDKN1B. n=1070, 1107 and 280 WT and n=889, 678 and 583 *Rspo2*^{Tg/Tg} granulosa cells (identified with DAPI) from 31, 30 and 10 and 28, 42 and 23 follicles respectively from at least 2 individual transplanted ovaries of each genotype. Data are presented in a *box and whisker plot representation to illustrate positive granulosa cell dispersion according to the follicle considered*. Student's *t* test, unpaired two-sided (*p<0.05, **p<0.01, ***p< 0.001). Scale bar, 50µm. (B) QRT-PCR analysis of *Ccnb1* (CyclinB1), *CcnD1* (CyclinD1), *Cdkn1a* (p21) and *Cdkn1b* (p27). Both inhibitors of CDK are upregulated while *Ccnd1* expression is decreased, confirming a reduction of the cell cycle progression in *Rspo2*^{Tg/Tg} granulosa cells. Data are presented as mean ± SEM. n=at least 3 individual ovaries per genotype. Student's *t* test, unpaired two-sided (*p<0.05).

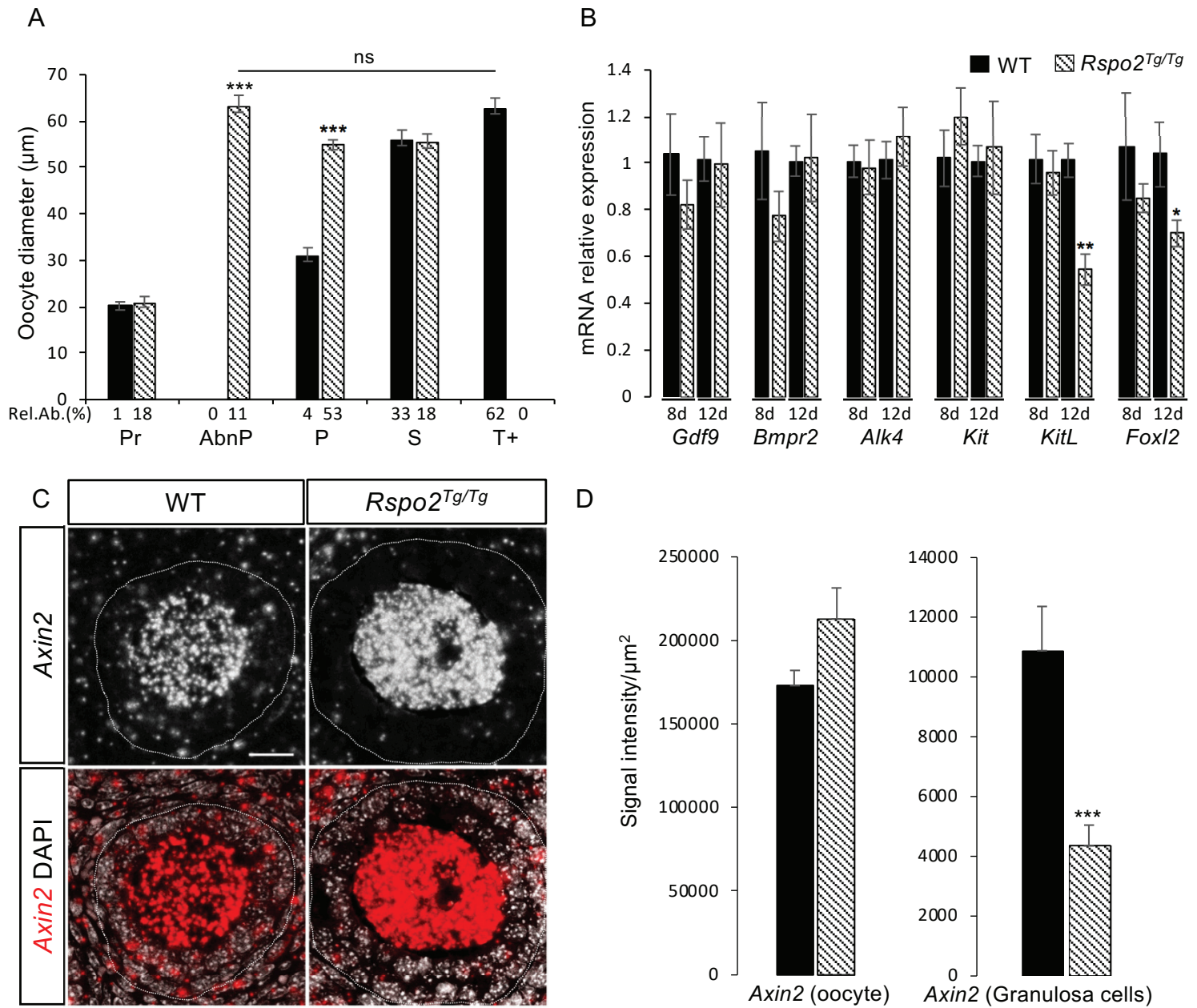


Figure 4. RSPO2 signaling specifically targets granulosa cells

(A) Quantitative analysis of the oocyte diameter size according to follicular stage in WT (n=55; black histogram) and *Rspo2*^{Tg/Tg} (n=90; striped histogram) transplanted ovaries at 21d (at least 3 ovaries of each genotype). **Pr**, primordial; **AbnPr**, abnormal primordial *Rspo2*^{Tg/Tg} specific follicles, **P**, primary; **S**, secondary; **T+**, tertiary and antral follicles. Data show that the oocyte growth is not impacted by the absence of *Rspo2* (mean ± SEM). Relative abundance (Rel.Ab.) of each follicular stage is indicated as percentage of total follicles. Student's *t* test, unpaired two-sided (**p<0.001). (B) QRT-PCR analysis of *Gdf9*, *Bmpr2* and *Alk4* (GDF9 receptors), *Kit* receptor (*Kit*), *Kit* ligand (*KitL*) and *Foxl2* expression. Data are presented as mean ± SEM. n=at least 3 ovaries from different embryos per genotype. Student's *t* test, unpaired two-sided (*p<0.05). (C) *In situ* hybridization analysis of *Axin2* expression and (D) signal quantification in WT and *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles at 12d (n=18 WT and n=14 *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles of 2 ovaries per genotype). In *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries, *Axin2* expression is unchanged within the oocyte but is decreased in granulosa cells when compared to WT. Data are presented as mean ± SEM. Student's *t* test, unpaired two-sided (**p<0.001). Scale bar, 20µm.

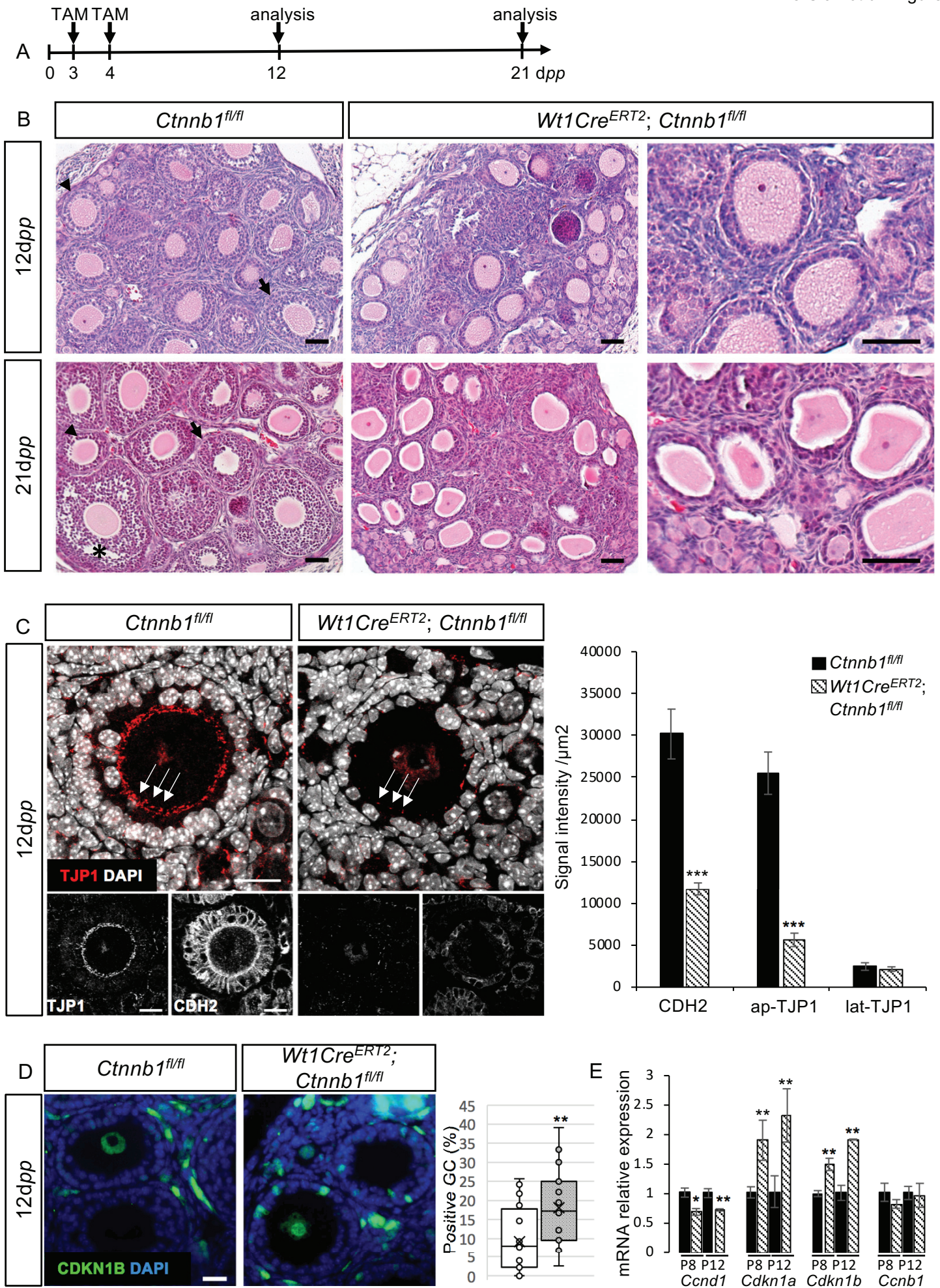
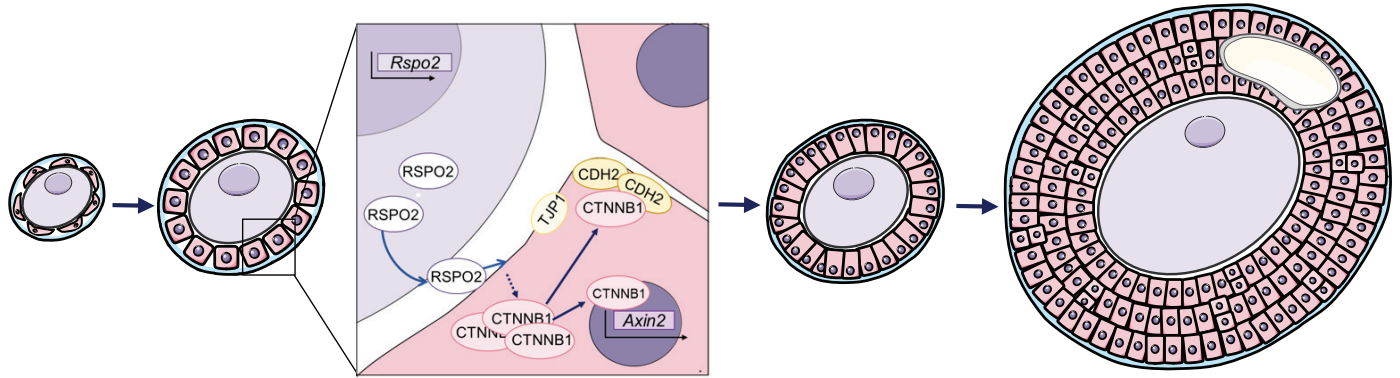


Figure 5. Genetic deletion of *Ctnnb1* in granulosa cells induces similar phenotypes as *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries

(A) Timeline of Tamoxifen treatments (TAM) at 3 and 4 dpp and ovary analyses of control (*Ctnnb1*^{fl/fl}) and mutant (*Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl}) mice at 12 and 21 dpp. (B) Histological section analyses (HE stainings) of *Ctnnb1*^{fl/fl} and *Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl} ovaries at 12 and 21 dpp. Mutant ovaries lack secondary (arrowheads), tertiary (arrows) and antral (*) follicles in contrast to *Ctnnb1*^{fl/fl} ovaries. Scale bars, 50 μ m. (C) Immunodetection and quantitative analyses of TJP1 (tight junctions) and CDH2 (adherens junctions) in *Ctnnb1*^{fl/fl} and *Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl} ovaries at 12 dpp. CDH2 and TJP1 signals are decreased in *Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl} follicles, notably at the interface between the oocyte and granulosa cells (indicated by white arrows). Data are presented as mean \pm SEM. n=6 *Ctnnb1*^{fl/fl} and n=7 *Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl} follicles of 1 transplanted ovary of each genotype. Student's *t* test, unpaired two-sided (***)p< 0.001). Scale bars, 20 μ m. (D) Immunodetection and quantitative analyses of CDKN1B (p27) to assess the proliferation status of granulosa cells in *Ctnnb1*^{fl/fl} and *Wt1Cre*^{ERT2}; *Ctnnb1*^{fl/fl} ovaries at 12 dpp (n=700 and 499 granulosa cells from 18 and 16 follicles respectively of 1 transplanted ovary per genotype). Data are presented in a *box and whisker plot representation to illustrate positive granulosa cell dispersion according to the follicle considered*. Student's *t* test, unpaired two-sided (*p<0.05, **p<0.01). Scale bar, 20 μ m. (E) QRT-PCR analysis of, *Ccnd1* (CyclinD1), *Cdkn1a* (p21), *Cdkn1b* (p27) and *Ccnb1* (CyclinB1). Data are presented as mean \pm SEM. n=at least 2 individual ovary per genotype. Student's *t* test, unpaired two-sided (*p<0.05, **p<0.01).

A Wildtype ovaries : poised to normal follicle growth



B *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries : unable to develop beyond primary cuboidal stage

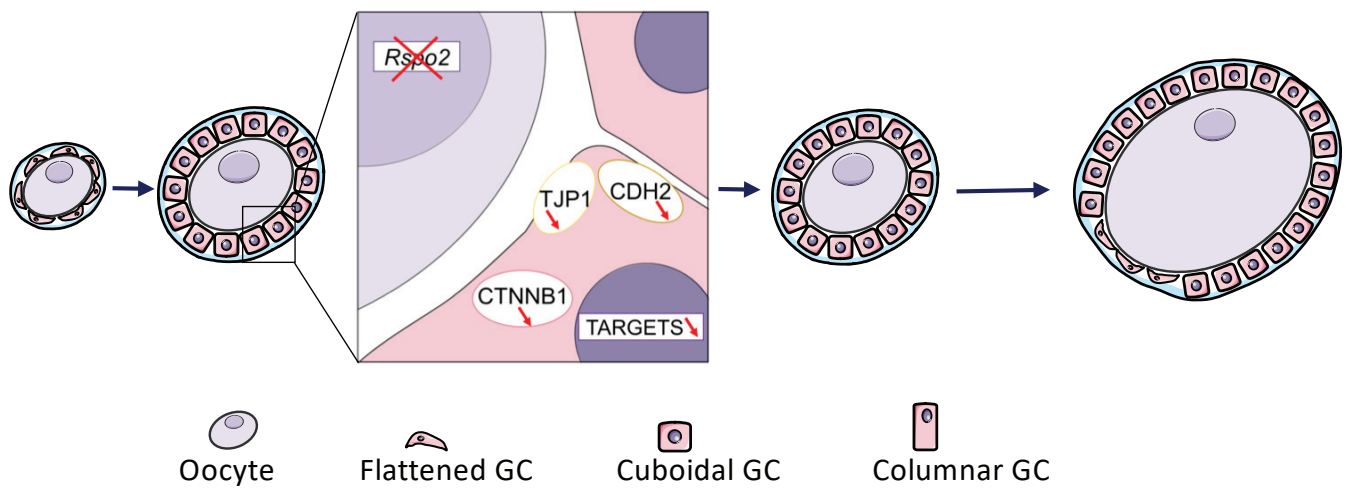


Figure 6. Proposed model for RSPO2 signaling in mouse ovaries.

(A) Follicular growth requires the oocyte-secreted RSPO2 protein. RSPO2 promotes the stabilization of CTNNB1 in the neighboring granulosa cells and in turn their proliferation and cell adhesion. This leads to follicular growth and development of antral follicles. (B) In the absence of RSPO2, activation of CTNNB1 is decreased in granulosa cells, thus leading to defects in proliferation and adhesion. Although oocyte growth occurs as in control follicles, the *Rspo2*^{Tg/Tg} follicles remain as primary follicles containing flattened and cuboidal granulosa cells.

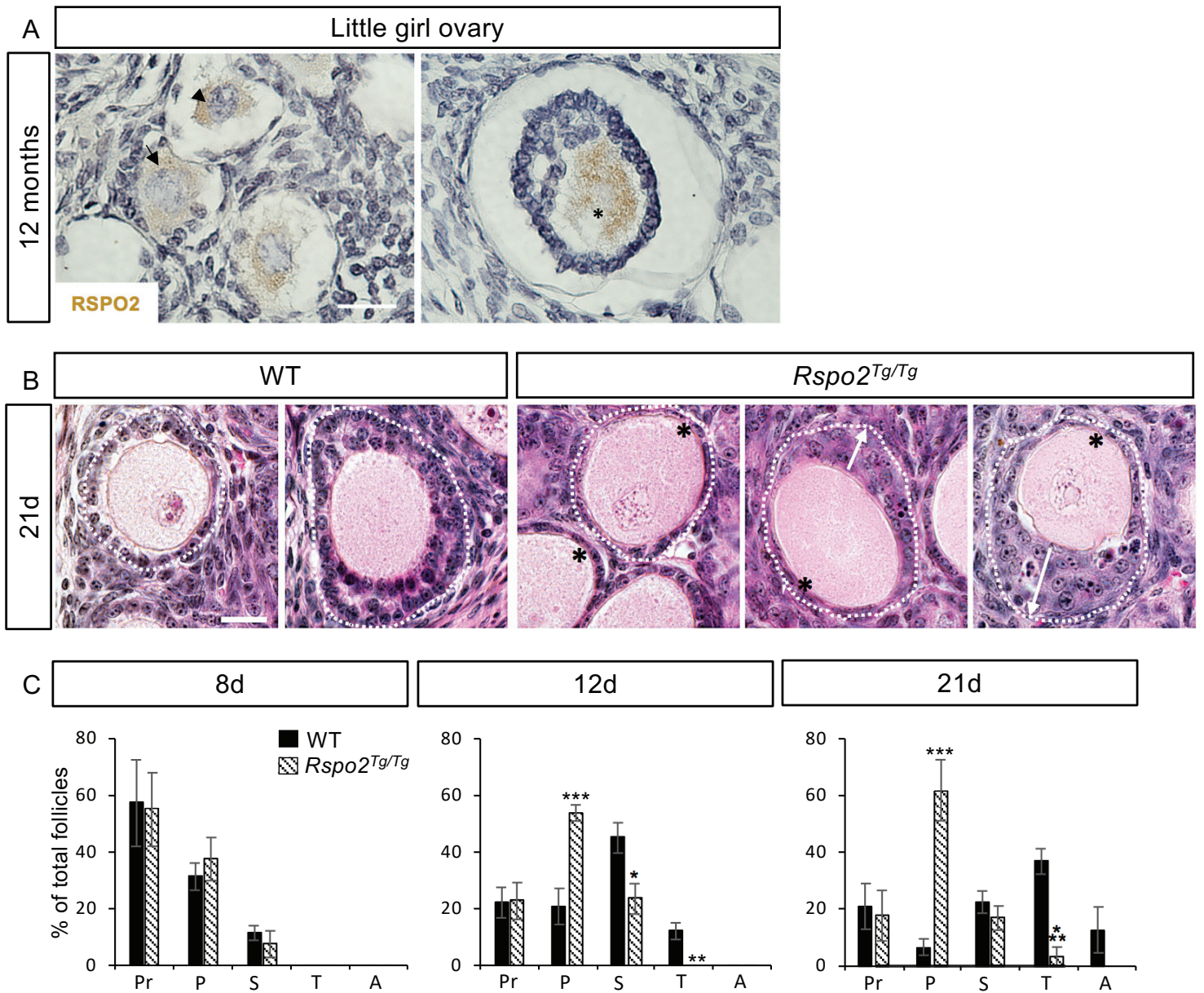


Figure S1. Absence of RSPO2 impairs primary to secondary follicle stage transition

(A) Immunolocalization of RSPO2 in a 12 month-old little girl ovary shows that RSPO2 is expressed in the cytoplasm of the oocyte in primordial (arrowhead), primary (arrow) and preantral (*) follicles. Scale bar, 50 μm . (B) In mice, histological sections (HE staining) analyses of wildtype (WT) ovaries at 21d reveal columnar granulosa cells with a basal localization of their nuclei in follicles containing one layer of granulosa cells. In two-layered follicles, nuclei of the external granulosa cells are localized close to the basal lamina whereas the granulosa nuclei of the internal layer are localized close to the oocyte. In contrast, granulosa cells do not exhibit the characteristic columnar shape of mature primary follicles in *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries; they have a cuboidal shape with centered nuclei. Flattened granulosa cells are also observed in mutant primary follicles (*). The follicles with multi-layered granulosa cells demonstrate asymmetrical granulosa cell growth (arrows). Scale bar, 20 μm . (C) Quantification of **Pr**, primordial; **P**, primary; **S**, secondary; **T**, tertiary; **A**, antral follicles in wildtype (black histograms) and *Rspo2*^{Tg/Tg} (striped histograms) ovaries at 8, 12 and 21d. The numbers are percentages of the different follicle populations. At 8d, the percentages of primordial, primary and secondary follicles are similar in both WT and *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries, but from 12d, secondary follicles are less abundant in *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries (23.5% compared to 53.8% in WT). At 21d, mutant ovaries are still constituted of 62% primary follicles whereas WT ovaries mainly contain secondary and tertiary growing follicles. Data are presented as mean \pm SEM. For WT, n=131(8d), 149 (12d), 133 (21d) and for *Rspo2*^{Tg/Tg}, n=120 (8d), 132 (12d), 118 (21d) follicles from at least 3 different mice per genotype. Student's t test, unpaired two-sided (*p<0.05, **p<0.01, ***p< 0.001).

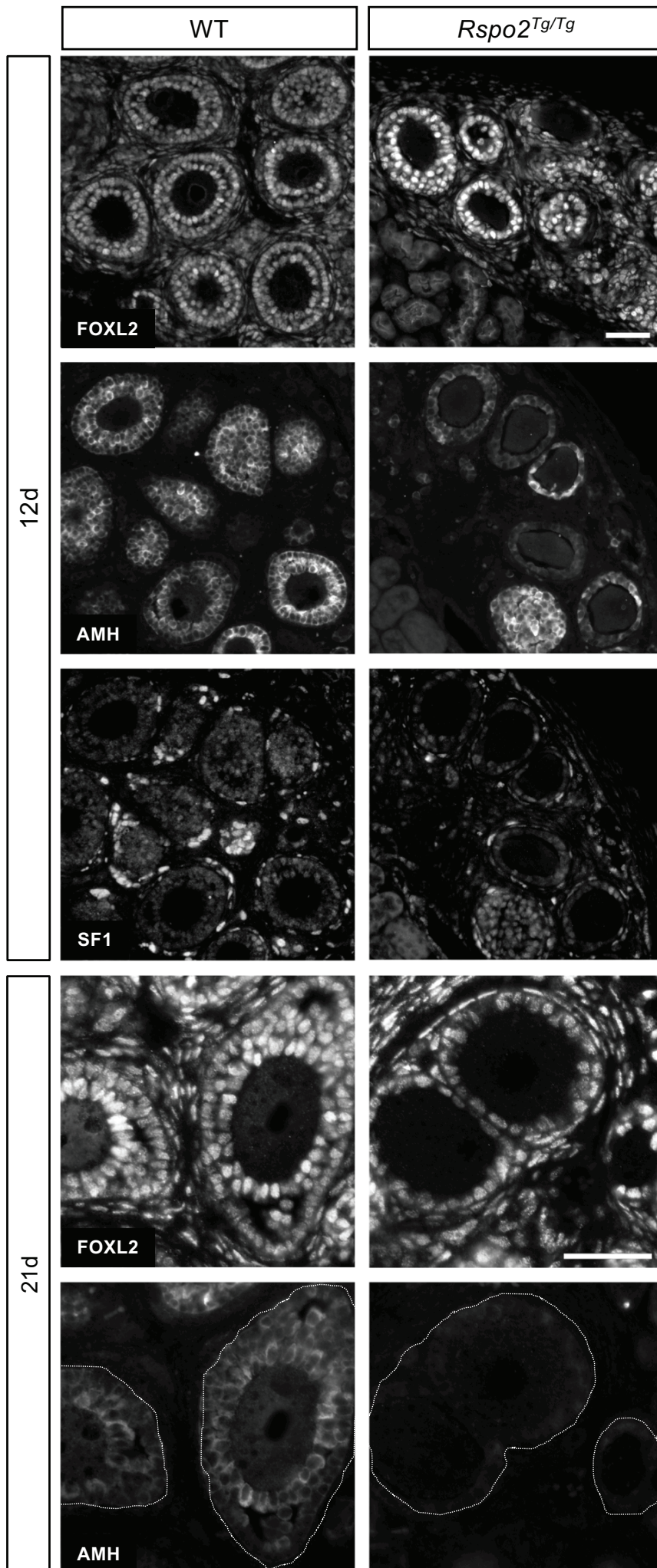


Figure S2. Granulosa cells lose their identity in absence of RSPO2

Immunodetection analyses of FOXL2 and AMH (granulosa cells) and SF1/NR5A1 (theca cells) in WT and *Rspo2*^{Tg/Tg} transplanted ovaries. Granulosa cells expressed FOXL2 and AMH at 12d and 21d, but AMH expression was reduced at 21d in *Rspo2*^{Tg/Tg} ovaries. The presence of SF1/NR5A1 (theca)-positive cells was observed in both genotypes. Scale bar, 50µm.

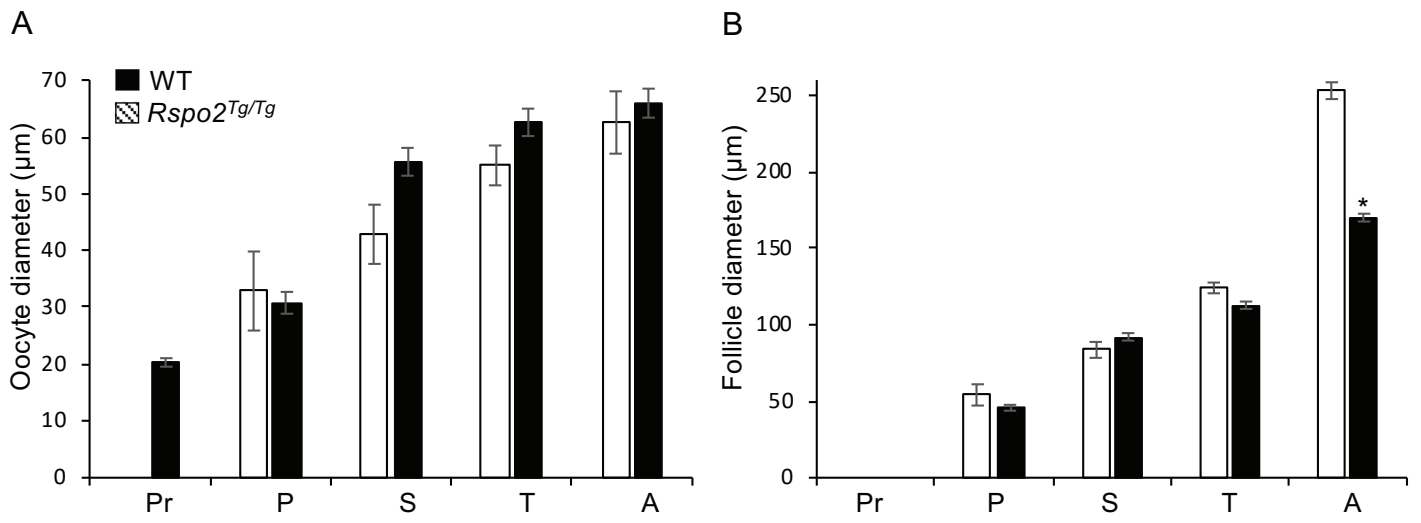


Figure S3. Transplantation does not hamper follicular growth in wildtype ovaries.

Quantitative analysis of the diameter size of oocytes (A) and follicles (B) in ovaries at 21dpp (White histograms; n=15 follicles of 1 ovary) and in transplanted ovaries at 21d (black histograms; n=55 follicles of 3 ovaries). **Pr**, primordial; **P**, primary; **S**, secondary; **T**, tertiary; **A**, antral follicles. Data are presented as mean \pm SEM.

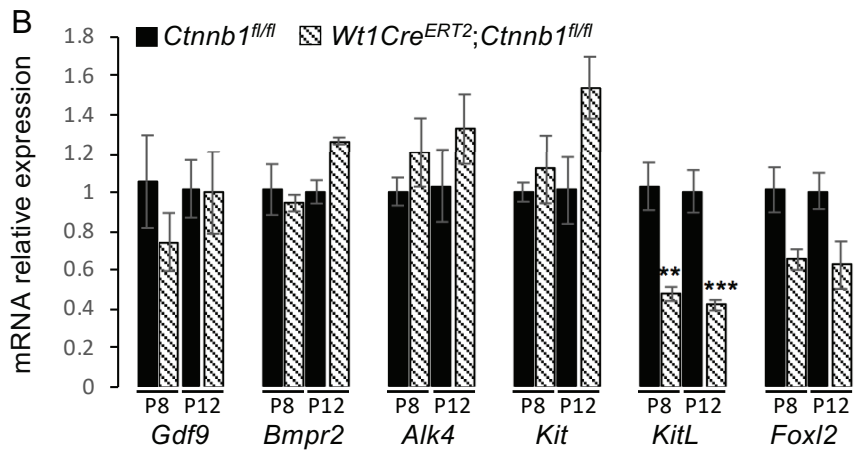
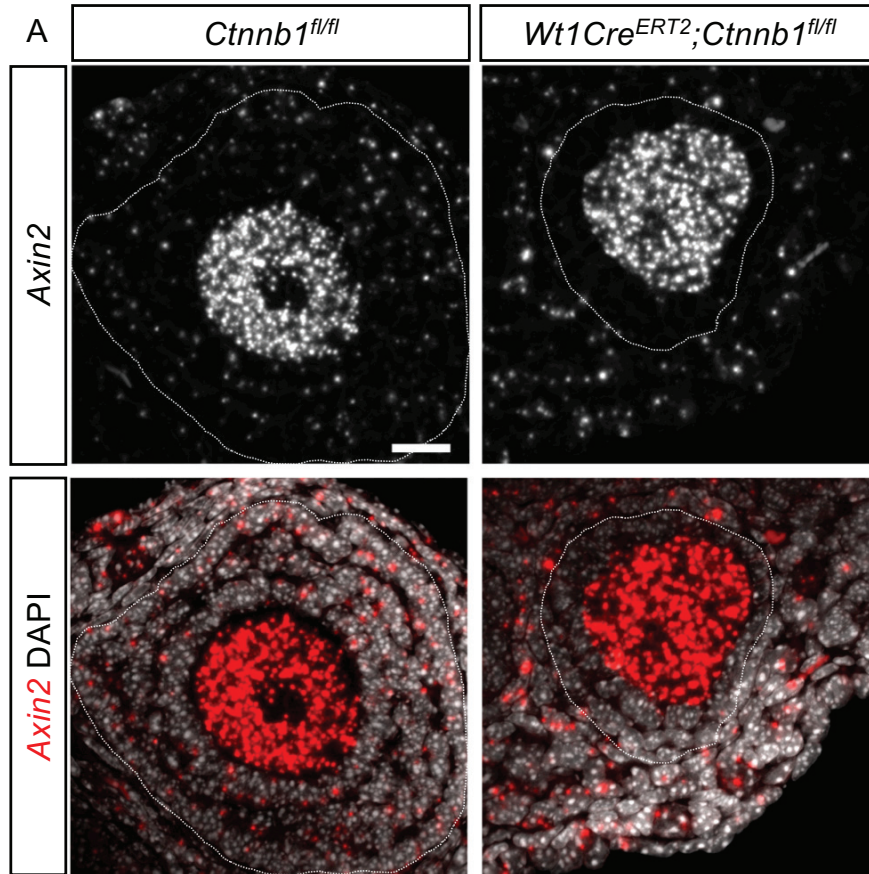


Figure S4. Oocyte-granulosa cell communication is altered by genetic deletion of *Ctnnb1* in granulosa cells

(A) *In situ* hybridization analysis of *Axin2* expression highlighting a down-regulation of *Axin2* in granulosa cells of *Wt1Cre^{ERT2};Ctnnb1^{fl/fl}* follicles but not in the oocyte in comparison to control (*Ctnnb1^{fl/fl}*) follicles at 21dpp. Scale bar, 20 μ m. (B) QRT-PCR analysis of *Gdf9*, *Bmpr2* and *Alk4* (GDF9 receptor), *Kit* receptor (*Kit*), *Kit* ligand (*KitL*) and *Foxl2* expression. Data are presented as mean \pm SEM. n=at least 3 ovaries per genotype. Student's *t* test, unpaired two-sided (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Table 1. Primers used for qRT-PCR Analyses

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Alk4</i>	AGAGGGTGGGGACCAAAC	TGCTTCATGTTGATTGTCTCG
<i>Bmpr2</i>	GAGCCCTCCCTTGACCTG	GTATCGACCCCGTCCAATC
<i>Ccnb1</i>	CGCTGAAAATTCTTGACAACG	TCTTAGCCAGGTGCTGCATA
<i>Ccnd1</i>	GAGATTGTGCCATCCATGC	CTCCTCTTCGCACTTCTGCT
<i>Cdkn1a</i>	AACATCTCAGGGCCGAAA	TGCGCTTGGAGTGATAGAAA
<i>Cdkn1b</i>	GTTAGCGGAGCAGTGTCCA	TCTGTTCTGTTGGCCCTTTT
<i>Foxl2</i>	GGCGTCGTGAACTCCTACA	TGCAGATGATGTGCGTGAG
<i>Gdf9</i>	CCCAGCAGAAGTCACCTCTA	CAGGTTAAACAGCAGGTCCA
<i>KitL</i>	CGGCTCTATTTGCTTGTA	TGCCCTTGTAAGACTTGACTG
<i>Kit</i>	GGTACATGGCTGCATTCTGA	TTTCAGGCACAGACACAACA

Figure S5. List of PCR primers used for qRT-PCR analyses

Bibliographie

- Abel, Margaret H., Alison N. Wootton, Vivienne Wilkins, Ilpo Huhtaniemi, Philip G. Knight, et Harry M. Charlton. 2000. « The Effect of a Null Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene on Mouse Reproduction ». *Endocrinology* 141 (5): 1795-1803. <https://doi.org/10.1210/endo.141.5.7456>.
- Aberle, H, A Bauer, J Stappert, A Kispert, et R Kemler. 1997. « beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. » *The EMBO Journal* 16 (13): 3797-3804. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797>.
- Adams, Ian R., et Anne McLaren. 2002. « Sexually Dimorphic Development of Mouse Primordial Germ Cells: Switching from Oogenesis to Spermatogenesis ». *Development* 129 (5): 1155-64.
- Adhya, Amit Kumar, et Ranjan Mohanty. 2019. « Triple Synchronous Tumour of Female Genital Tract: Cervical Squamous Cell Carcinoma, Right Ovarian Dermoid Cyst and Left Ovarian Benign Brenner Tumour ». *BMJ Case Reports* 12 (7). <https://doi.org/10.1136/bcr-2019-230695>.
- « Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique ». s. d. Consulté le 27 août 2019. <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2016/donnees/procreation/01-amp/synthese.htm>.
- AgoulNIK, Alexander I., Baisong Lu, Qichao Zhu, Cavatina Truong, Maria T. Ty, Nelson Arango, Kiran K. Chada, et Colin E. Bishop. 2002. « A Novel Gene, Pog, Is Necessary for Primordial Germ Cell Proliferation in the Mouse and Underlies the Germ Cell Deficient Mutation, Gcd ». *Human Molecular Genetics* 11 (24): 3047-53. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.24.3047>.
- Albrecht, Kenneth H, et Eva M Eicher. 2001. « Evidence That Sry Is Expressed in Pre-Sertoli Cells and Sertoli and Granulosa Cells Have a Common Precursor ». *Developmental Biology* 240 (1): 92-107. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0438>.
- Alexandre, Cyrille, Alberto Baena-Lopez, et Jean-Paul Vincent. 2014. « Patterning and Growth Control by Membrane-Tethered Wingless ». *Nature* 505 (7482): 180-85. <https://doi.org/10.1038/nature12879>.
- Amerongen, Renée van, Amanda Mikels, et Roel Nusse. 2008. « Alternative Wnt Signaling Is Initiated by Distinct Receptors ». *Science Signaling* 1 (35): re9-re9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.135re9>.
- Anakwe, Kelly, Lesley Robson, Julia Hadley, Paul Buxton, Vicki Church, Steve Allen, Christine Hartmann, et al. 2003. « Wnt Signalling Regulates Myogenic Differentiation in the Developing Avian Wing ». *Development* 130 (15): 3503-14. <https://doi.org/10.1242/dev.00538>.
- Anderson, E. L., A. E. Baltus, H. L. Roepers-Gajadien, T. J. Hassold, D. G. de Rooij, A. M. M. van Pelt, et D. C. Page. 2008. « Stra8 and Its Inducer, Retinoic Acid, Regulate Meiotic Initiation in Both Spermatogenesis and Oogenesis in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (39): 14976-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807297105>.
- Anderson, Robert, Trevor K. Copeland, Hans Schöler, Janet Heasman, et Christopher Wylie. 2000. « The onset of germ cell migration in the mouse embryo ». *Mechanisms of Development* 91 (1): 61-68. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00271-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00271-3).
- Angers, Stéphane, et Randall T. Moon. 2009. « Proximal Events in Wnt Signal Transduction ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (7): 468-77. <https://doi.org/10.1038/nrm2717>.
- Anjos-Afonso, Fernando, et Dominique Bonnet. 2007. « Nonhematopoietic/Endothelial SSEA-1+ Cells Define the Most Primitive Progenitors in the Adult Murine Bone Marrow Mesenchymal Compartment ». *Blood* 109 (3): 1298-1306. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030551>.
- Ansell, J. D., K. Samuel, D. G. Whittingham, C. E. Patek, K. Hardy, A. H. Handyside, K. W. Jones, A. L. Muggleton-Harris, A. H. Taylor, et M. L. Hooper. 1991. « Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase Deficiency, Haematopoiesis and Fertility in the Mouse ». *Development* 112 (2): 489-98.
- Anton, Roman, Hans A. Kestler, et Michael Köhl. 2007. « β -Catenin Signaling Contributes to Stemness and Regulates Early Differentiation in Murine Embryonic Stem Cells ». *FEBS Letters* 581 (27): 5247-54. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.012>.
- Ara, Toshiaki, Yuri Nakamura, Takeshi Egawa, Tatsuki Sugiyama, Kuniya Abe, Tadimitsu Kishimoto, Yasuhisa Matsui, et Takashi Nagasawa. 2003. « Impaired Colonization of the Gonads by Primordial Germ Cells in Mice Lacking a Chemokine, Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5319. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730719100>.
- Arce, L., N. N. Yokoyama, et M. L. Waterman. 2006. « Diversity of LEF/TCF Action in Development and Disease ». *Oncogene* 25 (57): 7492-7504. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210056>.

- Arias, Alfonso Martinez, et Penelope Hayward. 2006. « Filtering Transcriptional Noise during Development: Concepts and Mechanisms ». *Nature Reviews Genetics* 7 (1): 34-44. <https://doi.org/10.1038/nrg1750>.
- Armstrong, Jane F., Kathryn Pritchard-Jones, Wendy A. Bickmore, Nicholas D. Hastie, et Jonathan B.L. Bard. 1993. « The Expression of the Wilms' Tumour Gene, WT1, in the Developing Mammalian Embryo ». *Mechanisms of Development* 40 (1-2): 85-97. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(93\)90090-K](https://doi.org/10.1016/0925-4773(93)90090-K).
- Arnold, Katrin, Abby Sarkar, Mary Anna Yram, Jose M. Polo, Rod Bronson, Sumitra Sengupta, Marco Seandel, Niels Geijsen, et Konrad Hochedlinger. 2011. « Sox2+ Adult Stem and Progenitor Cells Are Important for Tissue Regeneration and Survival of Mice ». *Cell Stem Cell* 9 (4): 317-29. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.001>.
- Assié, Guillaume, Eric Letouzé, Martin Fassnacht, Anne Jouinot, Windy Luscap, Olivia Barreau, Hanin Omeiri, et al. 2014. « Integrated Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma ». *Nature Genetics* 46 (6): 607-12. <https://doi.org/10.1038/ng.2953>.
- Auguste, A., A.-A. Chassot, E. P. Grégoire, L. Renault, M. Pannetier, M. Treier, E. Pailhoux, et M.-C. Chaboissier. 2011. « Loss of R-Spondin1 and Foxl2 Amplifies Female-to-Male Sex Reversal in XX Mice ». *Sexual Development* 5 (6): 304-17. <https://doi.org/10.1159/000334517>.
- Bagheri-Fam, Stefan, Helena Sim, Pascal Bernard, Irumini Jayakody, Makoto M. Taketo, Gerd Scherer, et Vincent R. Harley. 2008. « Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal ». *Developmental Biology* 314 (1): 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.010>.
- Baltus, Andrew E, Douglas B Menke, Yueh-Chiang Hu, Mary L Goodheart, Anne E Carpenter, Dirk G de Rooij, et David C Page. 2006. « In Germ Cells of Mouse Embryonic Ovaries, the Decision to Enter Meiosis Precedes Premeiotic DNA Replication ». *Nature Genetics* 38 (12): 1430-34. <https://doi.org/10.1038/ng1919>.
- Barau, Joan, Aurélie Teissandier, Natasha Zamudio, Stéphanie Roy, Valérie Nalesso, Yann Hérault, Florian Guillou, et Déborah Bourc'his. 2016. « The DNA Methyltransferase DNMT3C Protects Male Germ Cells from Transposon Activity ». *Science* 354 (6314): 909-12. <https://doi.org/10.1126/science.aah5143>.
- Barker, Nick, et Hans Clevers. 2010. « Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein-Coupled Receptors as Markers of Adult Stem Cells ». *Gastroenterology* 138 (5): 1681-96. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.002>.
- Barker, Nick, Johan H. van Es, Jeroen Kuipers, Pekka Kujala, Maaïke van den Born, Miranda Cozijnsen, Andrea Haegebarth, et al. 2007. « Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene *Lgr5* ». *Nature* 449 (7165): 1003-7. <https://doi.org/10.1038/nature06196>.
- Barker, Nick, Meritxell Huch, Pekka Kujala, Marc van de Wetering, Hugo J. Snippert, Johan H. van Es, Toshiro Sato, et al. 2010. « *Lgr5*+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro ». *Cell Stem Cell* 6 (1): 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.013>.
- Barker, Nick, Maarten B. Rookmaaker, Pekka Kujala, Annie Ng, Marc Leushacke, Hugo Snippert, Marc van de Wetering, et al. 2012. « *Lgr5*+ve Stem/Progenitor Cells Contribute to Nephron Formation during Kidney Development ». *Cell Reports* 2 (3): 540-52. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.018>.
- Barrionuevo, Francisco, Ina Georg, Harry Scherthan, Charlotte Lécureuil, Florian Guillou, Michael Wegner, et Gerd Scherer. 2009. « Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8 ». *Developmental Biology* 327 (2): 301-12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.12.011>.
- Barrionuevo, Francisco, et Gerd Scherer. 2010. « SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, SOX Transcription Factors, 42 (3): 433-36. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.015>.
- Barrow, Jeffery R. 2006. « Wnt/PCP signaling: A veritable polar star in establishing patterns of polarity in embryonic tissues ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, The Wnt Signaling Pathway and Embryonic Polarity, 17 (2): 185-93. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.04.002>.
- Barsoum, Ivraym B., Jaspreet Kaur, Renshan S. Ge, Paul S. Cooke, et Humphrey Hung-Chang Yao. 2013. « Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice ». *The FASEB Journal* 27 (7): 2657-66. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225060>.
- Baudat, Frédéric, Yukiko Imai, et Bernard de Massy. 2013. « Meiotic Recombination in Mammals: Localization and Regulation ». *Nature Reviews Genetics* 14 (11): 794-806. <https://doi.org/10.1038/nrg3573>.
- Behrens, Jürgen, Boris-Alexander Jerchow, Martin Würtele, Jan Grimm, Christian Asbrand, Ralph Wirtz, Michael Köhl, Doris Wedlich, et Walter Birchmeier. 1998. « Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with β -Catenin, APC, and GSK3 β ». *Science* 280 (5363): 596-99. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.596>.
- Behrens, Jürgen, Jens P. von Kries, Michael Köhl, Laurakay Bruhn, Doris Wedlich, Rudolf Grosschedl, et Walter Birchmeier. 1996. « Functional Interaction of β -Catenin with the Transcription Factor LEF-1 ». *Nature* 382 (6592): 638-42. <https://doi.org/10.1038/382638a0>.
- Belenkaya, Tatyana Y., Yihui Wu, Xiaofang Tang, Bo Zhou, Longqiu Cheng, Yagya V. Sharma, Dong Yan, Erica M. Selva, et Xinhua Lin. 2008. « The Retromer Complex Influences Wnt Secretion by Recycling Wntless

- from Endosomes to the Trans-Golgi Network ». *Developmental Cell* 14 (1): 120-31. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.003>.
- Berge, Derk ten, Dorota Kurek, Tim Blauwkamp, Wouter Koole, Alex Maas, Elif Eroglu, Ronald K. Siu, et Roel Nusse. 2011. « Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells ». *Nature cell biology* 13 (9): 1070-75. <https://doi.org/10.1038/ncb2314>.
- Bernard, Pascal, Helena Sim, Kevin Knowler, Eric Vilain, et Vincent Harley. 2008. « Human SRY inhibits β -catenin-mediated transcription ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (12): 2889-2900. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.006>.
- Bernex, F., P. De Sepulveda, C. Kress, C. Elbaz, C. Delouis, et J. J. Panthier. 1996. « Spatial and Temporal Patterns of C-Kit-Expressing Cells in WlacZ/+ and WlacZ/WlacZ Mouse Embryos ». *Development (Cambridge, England)* 122 (10): 3023-33.
- Bessiène, Laura, Marc Lombès, et Claire Bouvattier. 2018. « Controverses et challenges sur le développement sexuel différent (DSD) ». *Annales d'Endocrinologie, Les Must de l'Endocrinologie* 2018, 79 (septembre): S22-30. [https://doi.org/10.1016/S0003-4266\(18\)31235-6](https://doi.org/10.1016/S0003-4266(18)31235-6).
- Beumer, Tim L., Hiroaki Kiyokawa, Hermien L. Roepers-Gajadien, Linda A. C. van den Bos, Tycho M. T. W. Lock, Iris S. Gademian, Derk H. Rutgers, Andrew Koff, et Dirk G. de Rooij. 1999. « Regulatory Role of P27kip1 in the Mouse and Human Testis ». *Endocrinology* 140 (4): 1834-40. <https://doi.org/10.1210/endo.140.4.6638>.
- Bhanot, Purnima, Marcel Brink, Cindy Harryman Samos, Jen-Chih Hsieh, Yanshu Wang, Jennifer P. Macke, Deborah Andrew, Jeremy Nathans, et Roel Nusse. 1996. « A New Member of the Frizzled Family from Drosophila Functions as a Wingless Receptor ». *Nature* 382 (6588): 225-30. <https://doi.org/10.1038/382225a0>.
- Biason-Lauber, Anna, Daniel Konrad, Monika Meyer, Carine deBeaufort, et Eugen J. Schoenle. 2009. « Ovaries and Female Phenotype in a Girl with 46,XY Karyotype and Mutations in the CBX2 Gene ». *The American Journal of Human Genetics* 84 (5): 658-63. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.016>.
- Binnerts, Minke E., Kyung-Ah Kim, Jessica M. Bright, Sejal M. Patel, Karolyn Tran, Mei Zhou, John M. Leung, et al. 2007. « R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (37): 14700-705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702305104>.
- Birk, Ohad S., Delane E. Casiano, Christopher A. Wassif, Tiziana Cogliati, Liping Zhao, Yangu Zhao, Alexander Grinberg, et al. 2000. « The LIM Homeobox Gene Lhx9 Is Essential for Mouse Gonad Formation ». *Nature* 403 (6772): 909-13. <https://doi.org/10.1038/35002622>.
- Blomhoff, Rune. 1994. « Transport and Metabolism of Vitamin a ». *Nutrition Reviews* 52 (2): S13-23. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1994.tb01382.x>.
- Bokhoven, Hans van, Jacopo Celli, Hülya Kayserili, Ellen van Beusekom, Sevim Balci, Wim Brussel, Flemming Skovby, et al. 2000. « Mutation of the Gene Encoding the ROR2 Tyrosine Kinase Causes Autosomal Recessive Robinow Syndrome ». *Nature Genetics* 25 (4): 423-26. <https://doi.org/10.1038/78113>.
- Bosl, George J., et Robert J. Motzer. 1997. « Testicular Germ-Cell Cancer ». *New England Journal of Medicine* 337 (4): 242-54. <https://doi.org/10.1056/NEJM199707243370406>.
- Bouilly, Justine, Reiner A. Veitia, et Nadine Binart. 2014. « NOBOX Is a Key FOXL2 Partner Involved in Ovarian Folliculogenesis ». *Journal of Molecular Cell Biology* 6 (2): 175-77. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju006>.
- Boulanger, Laurent, Maëlle Pannetier, Laurence Gall, Aurélie Allais-Bonnet, Maëva Elzaïat, Daniel Le Bourhis, Nathalie Daniel, et al. 2014. « FOXL2 Is a Female Sex-Determining Gene in the Goat ». *Current Biology* 24 (4): 404-8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.039>.
- Bovolenta, Paola, Pilar Esteve, Jose Maria Ruiz, Elsa Cisneros, et Javier Lopez-Rios. 2008. « Beyond Wnt Inhibition: New Functions of Secreted Frizzled-Related Proteins in Development and Disease ». *Journal of Cell Science* 121 (6): 737-46. <https://doi.org/10.1242/jcs.026096>.
- Bowles, Josephine, Chun-Wei Feng, Kim Miles, Jessica Ineson, Cassy Spiller, et Peter Koopman. 2016. « ALDH1A1 Provides a Source of Meiosis-Inducing Retinoic Acid in Mouse Fetal Ovaries ». *Nature Communications* 7 (1): 10845. <https://doi.org/10.1038/ncomms10845>.
- Bowles, Josephine, Deon Knight, Christopher Smith, Dagmar Wilhelm, Joy Richman, Satoru Mamiya, Kenta Yashiro, et al. 2006. « Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice ». *Science* 312 (5773): 596-600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>.
- Brack, Andrew S., Fabienne Murphy-Seiler, Jasmine Hanifi, Jürgen Deka, Sven Eyckerman, Charles Keller, Michel Aguet, et Thomas A. Rando. 2009. « BCL9 is an essential component of canonical Wnt signaling that mediates the differentiation of myogenic progenitors during muscle regeneration ». *Developmental Biology* 335 (1): 93-105. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.014>.

- Brannon, Mark, Miranda Gomperts, Lauro Sumoy, Randall T. Moon, et David Kimelman. 1997. « A β -catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus* ». *Genes & Development* 11 (18): 2359-70.
- Brantjes, Helen, Jeroen Roose, Marc van de Wetering, et Hans Clevers. 2001. « All Tcf HMG Box Transcription Factors Interact with Groucho-Related Co-Repressors ». *Nucleic Acids Research* 29 (7): 1410-19. <https://doi.org/10.1093/nar/29.7.1410>.
- Brault, V., R. Moore, S. Kutsch, M. Ishibashi, D. H. Rowitch, A. P. McMahon, L. Sommer, O. Boussadia, et R. Kemler. 2001. « Inactivation of the Beta-Catenin Gene by Wnt1-Cre-Mediated Deletion Results in Dramatic Brain Malformation and Failure of Craniofacial Development ». *Development (Cambridge, England)* 128 (8): 1253-64.
- Brennan, Jennifer, Jeannie Karl, et Blanche Capel. 2002. « Divergent Vascular Mechanisms Downstream of Sry Establish the Arterial System in the XY Gonad ». *Developmental Biology* 244 (2): 418-28. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0578>.
- Brennan, Jennifer, Christopher Tilmann, et Blanche Capel. 2003. « Pdgfr- α mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad ». *Genes & Development* 17 (6): 800-810. <https://doi.org/10.1101/gad.1052503>.
- Brotelle, Thibault, et Jacques-Olivier Bay. 2016. « La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie ». *Bulletin du Cancer* 103 (1): 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.09.011>.
- Bryja, Vitezslav, Emma R. Andersson, Alexandra Schambony, Milan Esner, Lenka Bryjová, Kristin K. Biris, Anita C. Hall, et al. 2009. « The Extracellular Domain of Lrp5/6 Inhibits Noncanonical Wnt Signaling In Vivo ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (3): 924-36. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-07-0711>.
- Budhu, Anuradha S., et Noa Noy. 2002. « Direct Channeling of Retinoic Acid between Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II and Retinoic Acid Receptor Sensitizes Mammary Carcinoma Cells to Retinoic Acid-Induced Growth Arrest ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (8): 2632-41. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.8.2632-2641.2002>.
- Buehr, M., S. Gu, et A. McLaren. 1993. « Mesonephric Contribution to Testis Differentiation in the Fetal Mouse ». *Development* 117 (1): 273-81.
- Bullejos, Monica, et Peter Koopman. 2005. « Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-YDOM sex reversal ». *Developmental Biology* 278 (2): 473-81. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.030>.
- Burlacu, A. 2003. « Regulation of Apoptosis by Bcl-2 Family Proteins. » 2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14594549/>.
- Busada, Jonathan T., et Christopher B. Geyer. 2016. « The Role of Retinoic Acid (RA) in Spermatogonial Differentiation1 ». *Biology of Reproduction* 94 (1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.135145>.
- Bussey, Kimberly J., Helen J. Lawce, Eleanor Himoe, Xiao Ou Shu, Nyla A. Heerema, Elizabeth J. Perlman, Susan B. Olson, et R. Ellen Magenis. 2001. « SNRPN Methylation Patterns in Germ Cell Tumors as a Reflection of Primordial Germ Cell Development ». *Genes, Chromosomes and Cancer* 32 (4): 342-52. <https://doi.org/10.1002/gcc.1199>.
- Capel, Blanche. 1998. « SEX IN THE 90s: SRY and the Switch to the Male Pathway ». *Annual Review of Physiology* 60 (1): 497-523. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.497>.
- Capela, Alexandra, et Sally Temple. 2002. « LeX/Ssea-1 Is Expressed by Adult Mouse CNS Stem Cells, Identifying Them as Nonependymal ». *Neuron* 35 (5): 865-75. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00835-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00835-8).
- Carabatsos, Mary Jo, Julia Elvin, Martin M Matzuk, et David F Albertini. 1998. « Characterization of Oocyte and Follicle Development in Growth Differentiation Factor-9-Deficient Mice ». *Developmental Biology* 204 (2): 373-84. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9087>.
- Carmon, Kendra S., Xing Gong, Qiushi Lin, Anthony Thomas, et Qingyun Liu. 2011. « R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (28): 11452-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106083108>.
- Carré, Gwenn-Aël, Pam Siggers, Marilena Xipolita, Paul Brindle, Beat Lutz, Sara Wells, et Andy Greenfield. 2018. « Loss of p300 and CBP disrupts histone acetylation at the mouse Sry promoter and causes XY gonadal sex reversal ». *Human Molecular Genetics* 27 (1): 190-98. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx398>.
- Castrillon, Diego H., Bradley J. Quade, T. Y. Wang, Catherine Quigley, et Christopher P. Crum. 2000. « The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17): 9585-90.
- Cau, Milena, Maria Addis, Rita Congiu, Cristiana Meloni, Antonio Cao, Simona Santaniello, Mario Loi, et al. 2006. « A Locus for Familial Skewed X Chromosome Inactivation Maps to Chromosome Xq25 in a

- Family with a Female Manifesting Lowe Syndrome ». *Journal of Human Genetics* 51 (11): 1030-36. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0049-6>.
- Cavallo, Robert A., Rachel T. Cox, Melissa M. Moline, Jeroen Roose, Gordon A. Polevoy, Hans Clevers, Mark Peifer, et Amy Bejsovec. 1998. « Drosophila Tcf and Groucho Interact to Repress Wingless Signalling Activity ». *Nature* 395 (6702): 604-8. <https://doi.org/10.1038/26982>.
- Cederroth, Christopher R., Jean-Luc Pitetti, Marilena D. Papaioannou, et Serge Nef. 2007. « Genetic Programs That Regulate Testicular and Ovarian Development ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 265-266 (février): 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.029>.
- Chaboissier, M.-C. 2004. « Functional Analysis of Sox8 and Sox9 during Sex Determination in the Mouse ». *Development* 131 (9): 1891-1901. <https://doi.org/10.1242/dev.01087>.
- Chae, J., M. J. Kim, J. H. Goo, S. Collier, D. Gubb, J. Charlton, P. N. Adler, et W. J. Park. 1999. « The Drosophila Tissue Polarity Gene Starry Night Encodes a Member of the Protocadherin Family ». *Development* 126 (23): 5421-29.
- Chambers, Ian, Jose Silva, Douglas Colby, Jennifer Nichols, Bianca Nijmeijer, Morag Robertson, Jan Vrana, Ken Jones, Lars Grotewold, et Austin Smith. 2007. « Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development ». *Nature* 450 (7173): 1230-34. <https://doi.org/10.1038/nature06403>.
- Chambon, P. 1996. « A Decade of Molecular Biology of Retinoic Acid Receptors ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (9): 940-54.
- Chang, Hua, et Martin M Matzuk. 2001. « Smad5 is required for mouse primordial germ cell development ». *Mechanisms of Development* 104 (1): 61-67. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00367-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00367-7).
- Chassot, A-A, Fariba Ranc, Elodie P. Gregoire, Hermien L. Roepers-Gajadien, Makoto M. Taketo, Giovanna Camerino, Dirk G. de Rooij, Andreas Schedl, et Marie-Christine Chaboissier. 2008a. « Activation of β -Catenin Signaling by Rspo1 Controls Differentiation of the Mammalian Ovary ». *Human Molecular Genetics* 17 (9): 1264-77. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn016>.
- , A-A, E. P. Gregoire, M. Magliano, R. Lavery, et M. C. Chaboissier. 2008b. « Genetics of Ovarian Differentiation: Rspo1, a Major Player ». *Sexual Development* 2 (4-5): 219-27. <https://doi.org/10.1159/000152038>.
- Chassot, A-A, Elodie P. Gregoire, Rowena Lavery, Makoto M. Taketo, Dirk G. de Rooij, Ian R. Adams, et Marie-Christine Chaboissier. 2011. « RSP01/ β -Catenin Signaling Pathway Regulates Oogonia Differentiation and Entry into Meiosis in the Mouse Fetal Ovary ». *PLoS ONE* 6 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025641>.
- Chassot, A-A, S. T. Bradford, A. Auguste, E. P. Gregoire, E. Pailhoux, D. G. de Rooij, A. Schedl, et M.-C. Chaboissier. 2012. « WNT4 and RSP01 Together Are Required for Cell Proliferation in the Early Mouse Gonad ». *Development* 139 (23): 4461-72. <https://doi.org/10.1242/dev.078972>.
- Chassot, A-A, Isabelle Gillot, et Marie-Christine Chaboissier. 2014. « R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation ». *REPRODUCTION* 148 (6): R97-110. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0177>.
- Chassot, A-A, Morgane Le Rolle, Maxime Jourden, Makoto M. Taketo, Norbert B. Ghyselinck, et Marie-Christine Chaboissier. 2017. « Constitutive WNT/CTNNB1 activation triggers spermatogonial stem cell proliferation and germ cell depletion ». *Developmental Biology* 426 (1): 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.04.010>.
- Chen, Guoqing, et Albert J Courey. 2000. « Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression ». *Gene* 249 (1): 1-16. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00161-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00161-X).
- Chen, Liang-Yu, Paula R. Brown, William B. Willis, et Edward M. Eddy. 2014. « Peritubular Myoid Cells Participate in Male Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance ». *Endocrinology* 155 (12): 4964-74. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1406>.
- Chen, Wei, Derk ten Berge, Jeff Brown, Seungkirl Ahn, Liaoyuan A. Hu, William E. Miller, Marc G. Caron, Larry S. Barak, Roel Nusse, et Robert J. Lefkowitz. 2003. « Dishevelled 2 Recruits SS-Arrestin 2 to Mediate Wnt5A-Stimulated Endocytosis of Frizzled 4 ». *Science* 301 (5638): 1391-94. <https://doi.org/10.1126/science.1082808>.
- Cheng, H., et C. P. Leblond. 1974. « Origin, Differentiation and Renewal of the Four Main Epithelial Cell Types in the Mouse Small Intestine. V. Unitarian Theory of the Origin of the Four Epithelial Cell Types ». *The American Journal of Anatomy* 141 (4): 537-61. <https://doi.org/10.1002/aja.1001410407>.
- Cheng, L, M-T Sung, P Cossu-Rocca, Td Jones, Gt MacLennan, J De Jong, A Lopez-Beltran, R Montironi, et Lhj Looijenga. 2007. « OCT4: Biological Functions and Clinical Applications as a Marker of Germ Cell Neoplasia ». *The Journal of Pathology* 211 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1002/path.2105>.
- Chiquoine, A. Duncan. 1954. « The Identification, Origin, and Migration of the Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo ». *The Anatomical Record* 118 (2): 135-46. <https://doi.org/10.1002/ar.1091180202>.

- Chuma, Shinichiro, et Norio Nakatsuji. 2001. « Autonomous Transition into Meiosis of Mouse Fetal Germ Cells in Vitro and Its Inhibition by gp130-Mediated Signaling ». *Developmental Biology* 229 (2): 468-79. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9989>.
- Ciemerych, M. A., D. Mesnard, et M. Zernicka-Goetz. 2000. « Animal and Vegetal Poles of the Mouse Egg Predict the Polarity of the Embryonic Axis, yet Are Nonessential for Development ». *Development* 127 (16): 3467-74.
- Clagett-Dame, Margaret, et Hector F. DeLuca. 2002. « The Role of Vitamin a in Mammalian Reproduction and Embryonic Development ». *Annual Review of Nutrition* 22 (1): 347-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102745E>.
- Clark, Ann M., Kristin K. Garland, et Lonnie D. Russell. 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 ». *Biology of Reproduction* 63 (6): 1825-38. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1825>.
- Clark, J. M., et E. M. Eddy. 1975. « Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse ». *Developmental Biology* 47 (1): 136-55. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90269-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90269-9).
- « Classification des tumeurs de l'ovaire (d'après OMS 2003) ». s. d., 3.
- Clevers, Hans, et Roel Nusse. 2012. « Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease ». *Cell* 149 (6): 1192-1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>.
- Cole, Megan F., Sarah E. Johnstone, Jamie J. Newman, Michael H. Kagey, et Richard A. Young. 2008. « Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells ». *Genes & Development* 22 (6): 746-55. <https://doi.org/10.1101/gad.1642408>.
- Colvin, Jennifer S., Rebecca P. Green, Jennifer Schmahl, Blanche Capel, et David M. Ornitz. 2001. « Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9 ». *Cell* 104 (6): 875-89. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00284-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00284-7).
- Combes, Alexander N., Dagmar Wilhelm, Tara Davidson, Elisabetta Dejana, Vincent Harley, Andrew Sinclair, et Peter Koopman. 2009. « Endothelial cell migration directs testis cord formation ». *Developmental Biology* 326 (1): 112-20. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.040>.
- Cong, Feng, Liang Schweizer, et Harold Varmus. 2004. « Wnt Signals across the Plasma Membrane to Activate the β -Catenin Pathway by Forming Oligomers Containing Its Receptors, Frizzled and LRP ». *Development* 131 (20): 5103-15. <https://doi.org/10.1242/dev.01318>.
- Cooke, Julie E., Janet Heasman, et Chris C. Wylie. 1996. « The Role of Interleukin-4 in the Regulation of Mouse Primordial Germ Cell Numbers ». *Developmental Biology* 174 (1): 14-21. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0047>.
- Cool, J., F.D. Carmona, J.C. Szucsik, et B. Capel. 2008. « Peritubular Myoid Cells Are Not the Migrating Population Required for Testis Cord Formation in the XY Gonad ». *Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 2 (3): 128-33. <https://doi.org/10.1159/000143430>.
- Cool, Jonah, Tony J. DeFalco, et Blanche Capel. 2011. « Vascular-mesenchymal cross-talk through Vegf and Pdgf drives organ patterning ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (1): 167-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010299108>.
- Covello, Kelly L., James Kehler, Hongwei Yu, John D. Gordan, Andrew M. Arsham, Cheng-Jun Hu, Patricia A. Labosky, M. Celeste Simon, et Brian Keith. 2006. « HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth ». *Genes & Development* 20 (5): 557-70. <https://doi.org/10.1101/gad.1399906>.
- Coveney, Douglas, Jonah Cool, Tim Oliver, et Blanche Capel. 2008. « Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ, the gonad ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (20): 7212-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707674105>.
- Crisponi, Laura, Manila Deiana, Angela Loi, Francesca Chiappe, Manuela Uda, Patrizia Amati, Luigi Bisceglia, et al. 2001. « The Putative Forkhead Transcription Factor FOXL2 Is Mutated in Blepharophimosis/Ptosis/Epicanthus Inversus Syndrome ». *Nature Genetics* 27 (2): 159. <https://doi.org/10.1038/84781>.
- Croce, Jenifer C., et David R. McClay. 2008. « Evolution of the Wnt Pathways ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 469: 3-18. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-469-2_1.
- Dadoun, Y., H. Azaïs, L. Keller, E. d'Orazio, P. Collinet, et C. Decanter. 2017. « Proposition systématique de préservation de la fertilité par congélation d'ovocytes en cas de tumeur ovarienne bénigne ». *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* 45 (6): 359-65. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2017.03.005>.
- Dalton, Stephen, et Paul D. Coverdell. 2015. « Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions ». *Trends in Cell Biology* 25 (10): 592. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.007>.

- Daniels, Danette L, et William I Weis. 2002. « ICAT Inhibits β -Catenin Binding to Tcf/Lef-Family Transcription Factors and the General Coactivator p300 Using Independent Structural Modules ». *Molecular Cell* 10 (3): 573-84. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00631-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00631-7).
- De Cian, M-C, E Pauper, R Bandiera, V P I Vidal, S Sacco, E P Gregoire, A-A Chassot, et al. 2017. « Amplification of R-Spondin1 Signaling Induces Granulosa Cell Fate Defects and Cancers in Mouse Adult Ovary ». *Oncogene* 36 (2): 208-18. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.191>.
- De Felici, Massimo, et Susanna Dolci. 1991. « Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers ». *Developmental Biology* 147 (1): 281-84. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(05\)80025-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(05)80025-9).
- De Felici, Massimo, Francesca Gioia Klinger, Donatella Farini, Maria Lucia Scaldaferrì, Saveria Iona, et Mara Lobascio. 2005. « Establishment of Oocyte Population in the Fetal Ovary: Primordial Germ Cell Proliferation and Oocyte Programmed Cell Death ». *Reproductive Biomedicine Online* 10 (2): 182-91.
- DeFalco, Tony, Indrashis Bhattacharya, Alyna V. Williams, Dustin M. Sams, et Blanche Capel. 2014. « Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (23): E2384-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400057111>.
- DeFalco, Tony, Satoru Takahashi, et Blanche Capel. 2011. « Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis ». *Developmental Biology* 352 (1): 14-26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.01.011>.
- Delva, Laurent, Jean-Noël Bastie, Cécile Rochette-Egly, Radhia Kraïba, Nicole Balitrand, Gilles Despouy, Pierre Chambon, et Christine Chomienne. 1999. « Physical and Functional Interactions between Cellular Retinoic Acid Binding Protein II and the Retinoic Acid-Dependent Nuclear Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (10): 7158-67.
- DiNapoli, Leo, Jordan Batchvarov, et Blanche Capel. 2006. « FGF9 Promotes Survival of Germ Cells in the Fetal Testis ». *Development* 133 (8): 1519-27. <https://doi.org/10.1242/dev.02303>.
- Dokshin, Gregoriy A, Andrew E Baltus, John J Eppig, et David C Page. 2013. « Oocyte Differentiation Is Genetically Dissociable from Meiosis in Mice ». *Nature Genetics* 45 (8): 877-83. <https://doi.org/10.1038/ng.2672>.
- Dolci, Susanna, Federica Campolo, et Massimo De Felici. 2015. « Gonadal development and germ cell tumors in mouse and humans ». *Seminars in Cell & Developmental Biology, Plasma membrane repair & Development and pathology of the gonad*, 45 (septembre): 114-23. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.10.002>.
- Dong, Jinwen, David F. Albertini, Katsuhiko Nishimori, T. Rajendra Kumar, Naifang Lu, et Martin M. Matzuk. 1996. « Growth Differentiation Factor-9 Is Required during Early Ovarian Folliculogenesis ». *Nature* 383 (6600): 531. <https://doi.org/10.1038/383531a0>.
- Drees, Frauke, Sabine Pokutta, Soichiro Yamada, W. James Nelson, et William I. Weis. 2005. « α -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin- β -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly ». *Cell* 123 (5): 903-15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.021>.
- Driancourt, M. A., K. Reynaud, R. Cortvrindt, et J. Smitz. 2000. « Roles of KIT and KIT LIGAND in Ovarian Function ». *Reviews of Reproduction* 5 (3): 143-52.
- Dudley, Brian, Caterina Palumbo, Jennifer Nalepka, et Kathleen Molyneaux. 2010. « BMP signaling controls formation of a primordial germ cell niche within the early genital ridges ». *Developmental Biology* 343 (1): 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.04.011>.
- Durlinger, Alexandra L. L., Jenny A. Visser, et Axel P. N. Themmen. 2002. « Regulation of Ovarian Function: The Role of Anti-Müllerian Hormone ». *Reproduction (Cambridge, England)* 124 (5): 601-9.
- Edson, Mark A., Ankur K. Nagaraja, et Martin M. Matzuk. 2009. « The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation ». *Endocrine Reviews* 30 (6): 624-712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>.
- Eguizabal, Cristina, Maria D. Boyano, Alejandro Diez-Torre, Ricardo Andrade, Noelia Andollo, Massimo De Felici, et Juan Aréchaga. 2002. « Interleukin-2 Induces the Proliferation of Mouse Primordial Germ Cells in Vitro ». *International Journal of Developmental Biology* 51 (8): 731-38. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072442ce>.
- Eicher, E. M., L. L. Washburn, J. B. Whitney, et K. E. Morrow. 1982. « Mus Poschiavinus Y Chromosome in the C57BL/6J Murine Genome Causes Sex Reversal ». *Science* 217 (4559): 535-37. <https://doi.org/10.1126/science.7089579>.
- Elmore, Susan. 2007. « Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death ». *Toxicologic Pathology* 35 (4): 495. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- Ephrussi, Anne, et Ruth Lehmann. 1992. « Induction of Germ Cell Formation by Oskar ». *Nature* 358 (6385): 387-92. <https://doi.org/10.1038/358387a0>.
- Eppig, John J. 2018. « Reproduction: Oocytes Call, Granulosa Cells Connect ». *Current Biology* 28 (8): R354-56. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.005>.

- Erickson, Gregory F., Chris Hofeditz, Michael Unger, W. Ross Allen, et Renato Dulbecco. 1985. « A Monoclonal Antibody to a Mammary Cell Line Recognizes Two Distinct Subtypes of Ovarian Granulosa Cells ». *Endocrinology* 117 (4): 1490-99. <https://doi.org/10.1210/endo-117-4-1490>.
- Evans, E. P., C. E. Ford, et M. F. Lyon. 1977. « Direct Evidence of the Capacity of the XY Germ Cell in the Mouse to Become an Oocyte ». *Nature* 267 (5610): 430-31. <https://doi.org/10.1038/267430a0>.
- Evans, Elizabeth, Cathryn Hogarth, Debra Mitchell, et Michael Griswold. 2014. « Riding the Spermatogenic Wave: Profiling Gene Expression Within Neonatal Germ and Sertoli Cells During a Synchronized Initial Wave of Spermatogenesis in Mice ». *Biology of Reproduction* 90 (5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118034>.
- Evans, M. J., et M. H. Kaufman. 1981. « Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos ». *Nature* 292 (5819): 154-56. <https://doi.org/10.1038/292154a0>.
- Extavour, Cassandra G., et Michael Akam. 2003. « Mechanisms of Germ Cell Specification across the Metazoans: Epigenesis and Preformation ». *Development* 130 (24): 5869-84. <https://doi.org/10.1242/dev.00804>.
- Fan, X., A. Molotkov, S.-I. Manabe, C. M. Donmoyer, L. Deltour, M. H. Foglio, A. E. Cuenca, W. S. Blaner, S. A. Lipton, et G. Duester. 2003. « Targeted Disruption of Aldh1a1 (Raldh1) Provides Evidence for a Complex Mechanism of Retinoic Acid Synthesis in the Developing Retina ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (13): 4637-48. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.13.4637-4648.2003>.
- Farini, Massimo De Felici and Donatella. 2011. « The Control of Cell Cycle in Mouse Primordial Germ Cells: Old and New Players ». *Current Pharmaceutical Design*. 31 décembre 2011. <http://www.eurekaselect.com/76252/article>.
- Faunes, Fernando, Penelope Hayward, Silvia Muñoz Descalzo, Sujash S. Chatterjee, Tina Balayo, Jamie Trott, Andrew Christoforou, et al. 2013. « A membrane-associated β -catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells ». *Development (Cambridge, England)* 140 (6): 1171-83. <https://doi.org/10.1242/dev.085654>.
- Felici, Massimo De. 2013. « Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells ». In . https://doi.org/10.1007/978-0-85729-826-3_2.
- Fiedler, Marc, Michael Graeb, Juliusz Mieszczynek, Trevor J Rutherford, Christopher M Johnson, et Mariann Bienz. 2015. « An ancient Pygo-dependent Wnt enhanceosome integrated by Chip/LDB-SSDP ». *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.09073>.
- Fisher, Alfred L., et Michael Caudy. 1998. « Groucho Proteins: Transcriptional Corepressors for Specific Subsets of DNA-Binding Transcription Factors in Vertebrates and Invertebrates ». *Genes & Development* 12 (13): 1931-40. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.1931>.
- Flack, Joshua E., Juliusz Mieszczynek, Nikola Novcic, et Mariann Bienz. 2017. « Wnt-Dependent Inactivation of the Groucho/TLE Co-repressor by the HECT E3 Ubiquitin Ligase Hyd/UBR5 ». *Molecular Cell* 67 (2): 181-193.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.009>.
- Fleming, Alice, Negar Ghahramani, Maggie Xiaoming Zhu, Emmanuèle C. Délot, et Eric Vilain. 2012. « Membrane β -Catenin and Adherens Junctions in Early Gonadal Patterning ». *Developmental Dynamics* 241 (11): 1782-98. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23870>.
- Fleming, Nicholas I., Kevin C. Knowler, Kyren A. Lazarus, Peter J. Fuller, Evan R. Simpson, et Colin D. Clyne. 2010. « Aromatase Is a Direct Target of FOXL2: C134W in Granulosa Cell Tumors via a Single Highly Conserved Binding Site in the Ovarian Specific Promoter ». *PLoS ONE* 5 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014389>.
- Forbes, A., et R. Lehmann. 1998. « Nanos and Pumilio Have Critical Roles in the Development and Function of Drosophila Germline Stem Cells ». *Development* 125 (4): 679-90.
- Fuentealba, Luis C., Edward Eivers, Atsushi Ikeda, Cecilia Hurtado, Hiroki Kuroda, Edgar M. Pera, et E. M. De Robertis. 2007. « Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal ». *Cell* 131 (5): 980-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.027>.
- Gadue, Paul, Tara L. Huber, Patrick J. Paddison, et Gordon M. Keller. 2006. « Wnt and TGF- β signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (45): 16806-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603916103>.
- Gagnon, Isabelle, Gregg Duester, et Pangala V. Bhat. 2002. « Kinetic Analysis of Mouse Retinal Dehydrogenase Type-2 (RALDH2) for Retinal Substrates ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1596 (1): 156-62. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(02\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(02)00213-3).
- Galas, Jerzy, Maria Słomczyńska, Katarzyna Knapczyk-Stwora, Małgorzata Durlej, Agnieszka Starowicz, Zbigniew Tabarowski, Katarzyna Rutka, et Maria Szołtyś. 2012. « Steroid levels and the spatiotemporal expression of steroidogenic enzymes and androgen receptor in developing ovaries of immature rats ». *Acta Histochemica* 114 (3): 207-16. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.04.006>.
- Gangaraju, Vamsi K., et Haifan Lin. 2009. « MicroRNAs: key regulators of stem cells ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (2): 116-25. <https://doi.org/10.1038/nrm2621>.

- Garcia, Thomas Xavier, Tony DeFalco, Blanche Capel, et Marie-Claude Hofmann. 2013. « Constitutive Activation of NOTCH1 Signaling in Sertoli Cells Causes Gonocyte Exit from Quiescence ». *Developmental Biology* 377 (1): 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.031>.
- Garcia-Ortiz, José Elias, Emanuele Pelosi, Shakib Omari, Timur Nedorezov, Yulan Piao, Jesse Karmazin, Manuela Uda, et al. 2009. « Foxl2 functions in sex determination and histogenesis throughout mouse ovary development ». *BMC Developmental Biology* 9 (juin): 36. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-36>.
- Gat, Uri, Ramanuj DasGupta, Linda Degenstein, et Elaine Fuchs. 1998. « De Novo Hair Follicle Morphogenesis and Hair Tumors in Mice Expressing a Truncated β -Catenin in Skin ». *Cell* 95 (5): 605-14. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81631-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81631-1).
- Gehring, Mary, Wolf Reik, et Steven Henikoff. 2009. « DNA Demethylation by DNA Repair ». *Trends in Genetics* 25 (2): 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.12.001>.
- Germain, Pierre, Pierre Chambon, Gregor Eichele, Ronald M. Evans, Mitchell A. Lazar, Mark Leid, Angel R. De Lera, Reuben Lotan, David J. Mangelsdorf, et Hinrich Gronemeyer. 2006a. « International Union of Pharmacology. LX. Retinoic Acid Receptors ». *Pharmacological Reviews* 58 (4): 712-25. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.4>.
- . 2006b. « International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors ». *Pharmacological Reviews* 58 (4): 760-72. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.7>.
- Germain, Pierre, Claudine Gaudon, Vivian Pogenberg, Sarah Sanglier, Alain Van Dorsselaer, Catherine A. Royer, Mitchell A. Lazar, William Bourguet, et Hinrich Gronemeyer. 2009. « Differential Action on Coregulator Interaction Defines Inverse Retinoid Agonists and Neutral Antagonists ». *Chemistry & Biology* 16 (5): 479-89. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.03.008>.
- Gershenson, David M. 2007. « Management of Ovarian Germ Cell Tumors ». *Journal of Clinical Oncology* 25 (20): 2938-43. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.10.8738>.
- Ghosh, Dolan, et Geraldine Seydoux. 2008. « Inhibition of Transcription by the Caenorhabditis elegans Germline Protein PIE-1: Genetic Evidence for Distinct Mechanisms Targeting Initiation and Elongation ». *Genetics* 178 (1): 235-43. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.083212>.
- Gierl, Mathias S., Wolfram H. Gruhn, Annika von Seggern, Nicole Maltry, et Christof Niehrs. 2012. « GADD45G Functions in Male Sex Determination by Promoting p38 Signaling and Sry Expression ». *Developmental Cell* 23 (5): 1032-42. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.09.014>.
- Gill, Mark E., Yueh-Chiang Hu, Yanfeng Lin, et David C. Page. 2011. « Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (18): 7443-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104501108>.
- Ginsburg, M., M. H. Snow, et A. McLaren. 1990. « Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo during Gastrulation ». *Development* 110 (2): 521-28.
- Glinka, Andrei, Christine Dolde, Nadine Kirsch, Ya-Lin Huang, Olga Kazanskaya, Dierk Ingelfinger, Michael Boutros, Cristina-Maria Cruiat, et Christof Niehrs. 2011. « LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling ». *EMBO Reports* 12 (10): 1055-61. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.175>.
- Gnessi, Lucio, Sabrina Basciani, Stefania Mariani, Mario Arizzi, Giovanni Spera, Chiayeng Wang, Cecilia Bondjers, Linda Karlsson, et Christer Betsholtz. 2000. « Leydig Cell Loss and Spermatogenic Arrest in Platelet-Derived Growth Factor (Pdgf)-a-Deficient Mice ». *The Journal of Cell Biology* 149 (5): 1019-26.
- Godin, I., C. Wylie, et J. Heasman. 1990. « Genital Ridges Exert Long-Range Effects on Mouse Primordial Germ Cell Numbers and Direction of Migration in Culture ». *Development* 108 (2): 357-63.
- Goldstein, Bob, Hisako Takeshita, Kota Mizumoto, et Hitoshi Sawa. 2006. « Wnt Signals Can Function as Positional Cues in Establishing Cell Polarity ». *Developmental Cell* 10 (3): 391-96. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.016>.
- Golestaneh, Nady, Elspeth Beauchamp, Shannon Fallen, Maria Kokkinaki, Aykut Üren, et Martin Dym. 2009. « Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells ». *REPRODUCTION* 138 (1): 151-62. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0510>.
- Gonen, Nitzan, Chris R. Futtner, Sophie Wood, S. Alexandra Garcia-Moreno, Isabella M. Salamone, Shiela C. Samson, Ryohei Sekido, Francis Poulat, Danielle M. Maatouk, et Robin Lovell-Badge. 2018. « Sex Reversal Following Deletion of a Single Distal Enhancer of Sox9 ». *Science* 360 (6396): 1469-73. <https://doi.org/10.1126/science.aas9408>.
- Gong, Bo, Weimin Shen, Wanghua Xiao, Yaping Meng, Anming Meng, et Shunji Jia. 2017. « The Sec14-like phosphatidylinositol transfer proteins Sec14I3/SEC14L2 act as GTPase proteins to mediate Wnt/Ca2+ signaling ». Édité par Hong Zhang. *eLife* 6 (mai): e26362. <https://doi.org/10.7554/eLife.26362>.
- Gonsalves, Foster C., Keren Klein, Brittany B. Carson, Shauna Katz, Laura A. Ekas, Steve Evans, Robert Nagourney, Timothy Cardozo, Anthony M. C. Brown, et Ramanuj DasGupta. 2011. « An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling

- pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (15): 5954-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017496108>.
- Goto, Satoshi, Misako Taniguchi, Masatoshi Muraoka, Hidenao Toyoda, Yukiko Sado, Masao Kawakita, et Shigeo Hayashi. 2001. « UDP–Sugar Transporter Implicated in Glycosylation and Processing of Notch ». *Nature Cell Biology* 3 (9): 816-22. <https://doi.org/10.1038/ncb0901-816>.
- Graham, Thomas A, Wilson K Clements, David Kimelman, et Wenqing Xu. 2002. « The Crystal Structure of the β -Catenin/ICAT Complex Reveals the Inhibitory Mechanism of ICAT ». *Molecular Cell* 10 (3): 563-71. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00637-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00637-8).
- Griswold, Michael D. 2016. « Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis ». *Physiological Reviews* 96 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>.
- Griswold, Michael D., Cathryn A. Hogarth, Josephine Bowles, et Peter Koopman. 2012. « Initiating Meiosis: The Case for Retinoic Acid1 ». *Biology of Reproduction* 86 (2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096610>.
- Grive, Kathryn J., et Richard N. Freiman. 2015. « The developmental origins of the mammalian ovarian reserve ». *Development (Cambridge, England)* 142 (15): 2554-63. <https://doi.org/10.1242/dev.125211>.
- Gross, Julia Christina, Varun Chaudhary, Kerstin Bartscherer, et Michael Boutros. 2012. « Active Wnt Proteins Are Secreted on Exosomes ». *Nature Cell Biology* 14 (10): 1036-45. <https://doi.org/10.1038/ncb2574>.
- Gruijters, Maria J. G., Jenny A. Visser, Alexandra L. L. Durlinger, et Axel P. N. Themmen. 2003. « Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, First International Meeting on Anti-Mullerian Hormone/Mullerian Inhibiting Substance, 211 (1): 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.09.024>.
- Gubb, D., et A. Garcia-Bellido. 1982. « A Genetic Analysis of the Determination of Cuticular Polarity during Development in *Drosophila Melanogaster* ». *Development* 68 (1): 37-57.
- Gubb, David, Clare Green, David Huen, Darin Coulson, Glynnis Johnson, David Tree, Simon Collier, et John Roote. 1999. « The balance between isoforms of the Prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs ». *Genes & Development* 13 (17): 2315-27.
- Gubbay, J., P. Koopman, J. Collignon, P. Burgoyne, et R. Lovell-Badge. 1990. « Normal Structure and Expression of Zfy Genes in XY Female Mice Mutant in Tdy ». *Development* 109 (3): 647-53.
- Guibert, S., T. Forne, et M. Weber. 2012. « Global Profiling of DNA Methylation Erasure in Mouse Primordial Germ Cells ». *Genome Research* 22 (4): 633-41. <https://doi.org/10.1101/gr.130997.111>.
- Guigon, Celine J., et Solange Magre. 2006. « Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion ». *Biology of Reproduction* 74 (3): 450-58. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.047134>.
- Guo, Ge, Yue Huang, Peter Humphreys, Xiaozhong Wang, et Austin Smith. 2011. « A PiggyBac-Based Recessive Screening Method to Identify Pluripotency Regulators ». *PLoS ONE* 6 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018189>.
- Guo, Nini, Charles Hawkins, et Jeremy Nathans. 2004. « Frizzled6 controls hair patterning in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (25): 9277-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402802101>.
- Habas, Raymond, Yoichi Kato, et Xi He. 2001. « Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1 ». *Cell* 107 (7): 843-54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00614-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00614-6).
- Habert, René, Hervé Lejeune, et José M Saez. 2001. « Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 179 (1): 47-74. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00461-0).
- Hacker, U., X. Lin, et N. Perrimon. 1997. « The *Drosophila* Sugarless Gene Modulates Wingless Signaling and Encodes an Enzyme Involved in Polysaccharide Biosynthesis ». *Development* 124 (18): 3565-73.
- Hahnel, A. C., et E. M. Eddy. 1986. « Cell Surface Markers of Mouse Primordial Germ Cells Defined by Two Monoclonal Antibodies ». *Gamete Research* 15 (1): 25-34. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120150104>.
- Hajkova, Petra, Katia Ancelin, Tanja Waldmann, Nicolas Lacoste, Ulrike C. Lange, Francesca Cesari, Caroline Lee, Genevieve Almouzni, Robert Schneider, et M. Azim Surani. 2008. « Chromatin Dynamics during Epigenetic Reprogramming in the Mouse Germ Line ». *Nature* 452 (7189): 877-81. <https://doi.org/10.1038/nature06714>.
- Hajkova, Petra, Sylvia Erhardt, Natasha Lane, Thomas Haaf, Osman El-Maarri, Wolf Reik, Jörn Walter, et M. Azim Surani. 2002. « Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells ». *Mechanisms of Development* 117 (1): 15-23. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00181-8).
- Hajkova, Petra, S. J. Jeffries, C. Lee, N. Miller, S. P. Jackson, et M. A. Surani. 2010. « Genome-Wide Reprogramming in the Mouse Germ Line Entails the Base Excision Repair Pathway ». *Science* 329 (5987): 78-82. <https://doi.org/10.1126/science.1187945>.

- Hammes, Annette, Jian-Kan Guo, Gudrun Lutsch, Joerg-Robert Leheste, Danilo Landrock, Ulrike Ziegler, Marie-Claire Gubler, et Andreas Schedl. 2001. « Two Splice Variants of the Wilms' Tumor 1 Gene Have Distinct Functions during Sex Determination and Nephron Formation ». *Cell* 106 (3): 319-29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00453-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00453-6).
- Hansson, Mattias, Dorthe R. Olesen, Janny M. L. Peterslund, Nina Engberg, Morten Kahn, Maria Winzi, Tino Klein, Poul Maddox-Hyttel, et Palle Serup. 2009. « A Late Requirement for Wnt and FGF Signaling during Activin-Induced Formation of Foregut Endoderm from Mouse Embryonic Stem Cells ». *Developmental Biology* 330 (2): 286-304. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.03.026>.
- Hao, Huai-Xiang, Yang Xie, Yue Zhang, Olga Charlat, Emma Oster, Monika Avello, Hong Lei, et al. 2012. « ZNRF3 Promotes Wnt Receptor Turnover in an R-Spondin-Sensitive Manner ». *Nature* 485 (7397): 195-200. <https://doi.org/10.1038/nature11019>.
- Hardy, Matthew P., Barry R. Zirkin, et Larry L. Ewing. 1989. « Kinetic Studies on the Development of the Adult Population of Leydig Cells in Testes of the Pubertal Rat ». *Endocrinology* 124 (2): 762-70. <https://doi.org/10.1210/endo-124-2-762>.
- Harris, Abigail, Pam Siggers, Silvia Corrochano, Nick Warr, Danielle Sagar, Daniel T. Grimes, Makoto Suzuki, et al. 2018. « ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (21): 5474-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801223115>.
- Hashimoto, N., R. Kubokawa, K. Yamazaki, M. Noguchi, et Y. Kato. 1990. « Germ Cell Deficiency Causes Testis Cord Differentiation in Reconstituted Mouse Fetal Ovaries ». *The Journal of Experimental Zoology* 253 (1): 61-70. <https://doi.org/10.1002/jez.1402530109>.
- Hausmann, George, Carla Bänziger, et Konrad Basler. 2007. « Helping Wingless Take Flight: How WNT Proteins Are Secreted ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (4): 331-36. <https://doi.org/10.1038/nrm2141>.
- Hay, B., L. Ackerman, S. Barbel, L. Y. Jan, et Y. N. Jan. 1988. « Identification of a Component of Drosophila Polar Granules ». *Development* 103 (4): 625-40.
- He, T. 1998. « Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway ». *Science* 281 (5382): 1509-12. <https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1509>.
- He, Xi, Mikhail Semenov, Keiko Tamai, et Xin Zeng. 2004. « LDL Receptor-Related Proteins 5 and 6 in Wnt/ β -Catenin Signaling: Arrows Point the Way ». *Development* 131 (8): 1663-77. <https://doi.org/10.1242/dev.01117>.
- He, Y.-F., B.-Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, et al. 2011. « Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA ». *Science* 333 (6047): 1303-7. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>.
- Hess, Rex A., et Luiz Renato de Franca. 2009. « Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium ». In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, édité par C. Yan Cheng, 636:1-15. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1.
- Heuvel, Marcel van den, Roel Nusse, Paul Johnston, et Peter A. Lawrence. 1989. « Distribution of the wingless gene product in drosophila embryos: A protein involved in cell-cell communication ». *Cell* 59 (4): 739-49. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90020-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90020-2).
- Hiramatsu, Ryuji, Shogo Matoba, Masami Kanai-Azuma, Naoki Tsunekawa, Yuko Katoh-Fukui, Masamichi Kurohmaru, Ken-ichiro Morohashi, Dagmar Wilhelm, Peter Koopman, et Yoshiakira Kanai. 2009. « A Critical Time Window of Sry Action in Gonadal Sex Determination in Mice ». *Development* 136 (1): 129-38. <https://doi.org/10.1242/dev.029587>.
- Hirshfield, Anne Newman. 1991. « Development of Follicles in the Mammalian Ovary ». In *International Review of Cytology*, édité par K. W. Jeon et M. Friedlander, 124:43-101. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7).
- Ho, Hsin-Yi Henry, Michael W. Susman, Jay B. Bikoff, Yun Kyoung Ryu, Andrea M. Jonas, Linda Hu, Rejji Kuruvilla, et Michael Eldon Greenberg. 2012. « Wnt5a-Ror-Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (11): 4044-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200421109>.
- Hogarth, Cathryn A., et Michael D. Griswold. 2013. « Retinoic Acid Regulation of Male Meiosis ». *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 20 (3): 217-23. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32836067cf>.
- Honecker, Friedemann, Hans Stoop, Ronald R de Krijger, Yun-Fai Chris Lau, Carsten Bokemeyer, et Leendert HJ Looijenga. 2004. « Pathobiological Implications of the Expression of Markers of Testicular Carcinoma in Situ by Fetal Germ Cells ». *The Journal of Pathology* 203 (3): 849-57. <https://doi.org/10.1002/path.1587>.
- Hoog-Labouret, Natalie, et Françoise Merlet. 2013. « Conséquences des traitements des cancers et préservation de la fertilité: État des connaissances et propositions Rapport de l'Institut national du cancer et de l'Agence de la biomédecine ». *Oncologie* 15 (5): 263-70. <https://doi.org/10.1007/s10269-013-2281-y>.

- Hoppler, Stefan, et Claire Louise Kavanagh. 2007. « Wnt Signalling: Variety at the Core ». *Journal of Cell Science* 120 (3): 385-93. <https://doi.org/10.1242/jcs.03363>.
- Horton, Claire, et Malcolm Maden. 1995. « Endogenous Distribution of Retinoids during Normal Development and Teratogenesis in the Mouse Embryo ». *Developmental Dynamics* 202 (3): 312-23. <https://doi.org/10.1002/aja.1002020310>.
- Houbaviy, Hristo B., Michael F. Murray, et Phillip A. Sharp. 2003. « Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs ». *Developmental Cell* 5 (2): 351-58. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00227-2).
- Hovanes, Karine, Tony W.H. Li, Jesus E. Munguia, Trung Truong, Tatjana Milovanovic, J. Lawrence Marsh, Randall F. Holcombe, et Marian L. Waterman. 2001. « Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. » *Nature Genetics* 28 (1): 53-57. <https://doi.org/10.1038/88264>.
- Hsieh, Jen-Chih, Laurent Kodjabachian, Martha L. Rebbert, Amir Rattner, Philip M. Smallwood, Cynthia Harryman Samos, Roel Nusse, Igor B. Dawid, et Jeremy Nathans. 1999. « A New Secreted Protein That Binds to Wnt Proteins and Inhibits Their Activities ». *Nature* 398 (6726): 431-36. <https://doi.org/10.1038/18899>.
- Hsu, Wei, Reena Shakya, et Frank Costantini. 2001. « Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice ». *The Journal of Cell Biology* 155 (6): 1055-64. <https://doi.org/10.1083/jcb.200107066>.
- Hu, Yueh-Chiang, Peter K. Nicholls, Y. Q. Shirleen Soh, Joseph R. Daniele, Jan Philipp Junker, Alexander van Oudenaarden, et David C. Page. 2015. « Licensing of Primordial Germ Cells for Gametogenesis Depends on Genital Ridge Signaling ». *PLoS Genetics* 11 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005019>.
- Hu, Yueh-Chiang, Leah M. Okumura, et David C. Page. 2013. « Gata4 Is Required for Formation of the Genital Ridge in Mice ». *PLoS Genetics* 9 (7): e1003629. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003629>.
- Huber, Andrew H., W. James Nelson, et William I. Weis. 1997. « Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin ». *Cell* 90 (5): 871-82. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80352-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80352-9).
- Huber, Andrew H., et William I. Weis. 2001. « The Structure of the β -Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by β -Catenin ». *Cell* 105 (3): 391-402. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00330-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00330-0).
- Huch, Meritxell, Paola Bonfanti, Sylvia F Boj, Toshiro Sato, Cindy J M Loomans, Marc van de Wetering, Mozhdeh Sojoodi, et al. 2013. « Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis ». *The EMBO Journal* 32 (20): 2708-21. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.204>.
- Huch, Meritxell, Craig Dorrell, Sylvia F. Boj, Johan H. van Es, Marc van de Wetering, Vivian S.W. Li, Karien Hamer, et al. 2013. « In vitro expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration ». *Nature* 494 (7436): 247-50. <https://doi.org/10.1038/nature11826>.
- Huelsken, Joerg, Regina Vogel, Bettina Erdmann, George Cotsarelis, et Walter Birchmeier. 2001. « β -Catenin Controls Hair Follicle Morphogenesis and Stem Cell Differentiation in the Skin ». *Cell* 105 (4): 533-45. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00336-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00336-1).
- Hunt, Patricia A., et Terry J. Hassold. 2008. « Human female meiosis: what makes a good egg go bad? » *Trends in Genetics* 24 (2): 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.11.010>.
- Illmensee, Karl, et Anthony P. Mahowald. 1974. « Transplantation of Posterior Polar Plasm in Drosophila. Induction of Germ Cells at the Anterior Pole of the Egg ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (4): 1016-20.
- Irie, Naoko, Leehee Weinberger, Walfred W. C. Tang, Toshihiro Kobayashi, Sergey Viukov, Yair S. Manor, Sabine Dietmann, Jacob H. Hanna, et M. Azim Surani. 2015. « SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate ». *Cell* 160 (1): 253-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.013>.
- Ishitani, Tohru, Satoshi Kishida, Junko Hyodo-Miura, Naoto Ueno, Jun Yasuda, Marian Waterman, Hiroshi Shibuya, Randall T. Moon, Jun Ninomiya-Tsuji, et Kunihiko Matsumoto. 2003. « The TAK1-NLK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Functions in the Wnt-5a/Ca²⁺ Pathway To Antagonize Wnt/ β -Catenin Signaling ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (1): 131-39. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.1.131-139.2003>.
- Itasaki, Nobue, C. Michael Jones, Sara Mercurio, Alison Rowe, Pedro M. Domingos, James C. Smith, et Robb Krumlauf. 2003. « Wise, a Context-Dependent Activator and Inhibitor of Wnt Signalling ». *Development* 130 (18): 4295-4305. <https://doi.org/10.1242/dev.00674>.
- Ivanov, I., K. C. Lo, L. Hawthorn, J. K. Cowell, et Y. Ionov. 2007. « Identifying Candidate Colon Cancer Tumor Suppressor Genes Using Inhibition of Nonsense-Mediated mRNA Decay in Colon Cancer Cells ». *Oncogene* 26 (20): 2873-84. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210098>.
- Jackson, Steven A., Jacqueline Schiesser, Edouard G. Stanley, et Andrew G. Elefanty. 2010. « Differentiating Embryonic Stem Cells Pass through 'Temporal Windows' That Mark Responsiveness to Exogenous and

- Paracrine Mesendoderm Inducing Signals ». *PLoS ONE* 5 (5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010706>.
- Jacobs, P. A., et A. Ross. 1966. « Structural Abnormalities of the Y Chromosome in Man ». *Nature* 210 (5034): 352-54. <https://doi.org/10.1038/210352a0>.
- Jaks, Viljar, Nick Barker, Maria Kasper, Johan H. van Es, Hugo J. Snippert, Hans Clevers, et Rune Toftgård. 2008. « Lgr5 Marks Cycling, yet Long-Lived, Hair Follicle Stem Cells ». *Nature Genetics* 40 (11): 1291-99. <https://doi.org/10.1038/ng.239>.
- Jameson, Samantha A., Yi-Tzu Lin, et Blanche Capel. 2012. « Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling ». *Developmental biology* 370 (1): 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.009>.
- Jameson, Samantha A., Anirudh Natarajan, Jonah Cool, Tony DeFalco, Danielle M. Maatouk, Lindsey Mork, Steven C. Munger, et Blanche Capel. 2012. « Temporal Transcriptional Profiling of Somatic and Germ Cells Reveals Biased Lineage Priming of Sexual Fate in the Fetal Mouse Gonad ». Édité par Gregory S. Barsh. *PLoS Genetics* 8 (3): e1002575. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002575>.
- Jan, Sabrina Z., Geert Hamer, Sjoerd Repping, Dirk G. de Rooij, Ans M.M. van Pelt, et Tinke L. Vormer. 2012. « Molecular Control of Rodent Spermatogenesis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822 (12): 1838-50. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.008>.
- Janda, Claudia Y., Luke T. Dang, Changjiang You, Junlei Chang, Wim de Lau, Zhendong A. Zhong, Kelley S. Yan, et al. 2017. « Surrogate Wnt Agonists That Phenocopy Canonical Wnt and β -Catenin Signalling ». *Nature* 545 (7653): 234-37. <https://doi.org/10.1038/nature22306>.
- Jeays-Ward, K. 2003. « Endothelial and Steroidogenic Cell Migration Are Regulated by WNT4 in the Developing Mammalian Gonad ». *Development* 130 (16): 3663-70. <https://doi.org/10.1242/dev.00591>.
- Jha, Kula N., Swamy K. Tripurani, et Gibbes R. Johnson. 2017. « TSSK6 Is Required for γ H2AX Formation and the Histone-to-Protamine Transition during Spermiogenesis ». *Journal of Cell Science* 130 (10): 1835-44. <https://doi.org/10.1242/jcs.202721>.
- Jiang, Xiaomo, Huai-Xiang Hao, Joseph D. Growney, Steve Woolfenden, Cindy Bottiglio, Nicholas Ng, Bo Lu, et al. 2013. « Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (31): 12649-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307218110>.
- Jones, Steve E., et Catherine Jomary. 2002. « Secreted Frizzled-Related Proteins: Searching for Relationships and Patterns ». *BioEssays* 24 (9): 811-20. <https://doi.org/10.1002/bies.10136>.
- Judson, Robert L., Joshua Babiarz, Monica Venere, et Robert Blelloch. 2009. « Embryonic stem cell specific microRNAs promote induced pluripotency ». *Nature biotechnology* 27 (5): 459-61. <https://doi.org/10.1038/nbt.1535>.
- Kafri, T, M Ariel, M Brandeis, R Shemer, L Urven, J McCarrey, H Cedar, et A Razin. 1992. « Developmental Pattern of Gene-Specific DNA Methylation in the Mouse Embryo and Germ Line. » *Genes & Development* 6 (5): 705-14. <https://doi.org/10.1101/gad.6.5.705>.
- Karl, Jeannie, et Blanche Capel. 1998. « Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium ». *Developmental Biology* 203 (2): 323-33. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9068>.
- Kashimada, Kenichi, Emanuele Pelosi, Huijun Chen, David Schlessinger, Dagmar Wilhelm, et Peter Koopman. 2011. « FOXL2 and BMP2 Act Cooperatively to Regulate Follistatin Gene Expression during Ovarian Development ». *Endocrinology* 152 (1): 272-80. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0636>.
- Kato, Yuzuru, Masahiro Kaneda, Kenichiro Hata, Kenji Kumaki, Mizue Hisano, Yuji Kohara, Masaki Okano, En Li, Masami Nozaki, et Hiroyuki Sasaki. 2007. « Role of the Dnmt3 Family in de Novo Methylation of Imprinted and Repetitive Sequences during Male Germ Cell Development in the Mouse ». *Human Molecular Genetics* 16 (19): 2272-80. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm179>.
- Katoh, Masaru. 2005. « WNT/PCP signaling pathway and human cancer (Review) ». *Oncology Reports* 14 (6): 1583-88. <https://doi.org/10.3892/or.14.6.1583>.
- . 2017. « Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review) ». *International Journal of Oncology* 51 (5): 1357-69. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4129>.
- Katoh, Masuko, et Masaru Katoh. 2017. « Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 40 (3): 587-606. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3071>.
- Kayhan, Gulsum, Pınar Calis, Deniz Karcaaltincaba, et Esra Tug. 2019. « Prenatal diagnosis of campomelic dysplasia due to SOX9 deletion ». *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 0 (0): 1-2. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1601165>.
- Kazanskaya, Olga, Andrei Glinka, Ivan del Barco Barrantes, Peter Stanek, Christof Niehrs, et Wei Wu. 2004. « R-Spondin2 Is a Secreted Activator of Wnt/ β -Catenin Signaling and Is Required for Xenopus Myogenesis ». *Developmental Cell* 7 (4): 525-34. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.019>.

- Kazanskaya, Olga, Andrei Glinka, Ivan del Barco Barrantes, Peter Stannek, Christof Niehrs, et Wei Wu. 2004. « R-Spondin2 Is a Secreted Activator of Wnt/ β -Catenin Signaling and Is Required for Xenopus Myogenesis ». *Developmental Cell* 7 (4): 525-34. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.019>.
- Kedde, Martijn, Markus J. Strasser, Bijan Boldajipour, Joachim A. F. Oude Vrielink, Krasimir Slanchev, Carlos le Sage, Remco Nagel, et al. 2007. « RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target MRNA ». *Cell* 131 (7): 1273-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.034>.
- Kehler, James, Elena Tolkunova, Birgit Koschorz, Maurizio Pesce, Luca Gentile, Michele Boiani, Hilda Lomeli, et al. 2004. « Oct4 is required for primordial germ cell survival ». *EMBO Reports* 5 (11): 1078-83. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400279>.
- Kelly, Kevin F., Deborah Y. Ng, Gowtham Jayakumaran, Geoffrey A. Wood, Hiroshi Koide, et Bradley W. Doble. 2011. « β -Catenin Enhances Oct-4 Activity and Reinforces Pluripotency through a TCF-Independent Mechanism ». *Cell stem cell* 8 (2): 214-27. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.010>.
- Kerr, J. B., et C. M. Knell. 1988. « The Fate of Fetal Leydig Cells during the Development of the Fetal and Postnatal Rat Testis ». *Development* 103 (3): 535-44.
- Kielman, Menno F., Maaret Rindapää, Claudia Gaspar, Nicole van Poppel, Cor Breukel, Sandra van Leeuwen, Makoto Mark Taketo, Scott Roberts, Ron Smits, et Riccardo Fodde. 2002. « Apc Modulates Embryonic Stem-Cell Differentiation by Controlling the Dosage of β -Catenin Signaling ». *Nature Genetics* 32 (4): 594-605. <https://doi.org/10.1038/ng1045>.
- Kikuchi, Akira, Hideki Yamamoto, et Akira Sato. 2009. « Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways ». *Trends in Cell Biology* 19 (3): 119-29. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.01.003>.
- Kim, Yuna, Nathan Bingham, Ryohei Sekido, Keith L. Parker, Robin Lovell-Badge, et Blanche Capel. 2007. « Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (42): 16558-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702581104>.
- Kim, Yuna, Akio Kobayashi, Ryohei Sekido, Leo DiNapoli, Jennifer Brennan, Marie-Christine Chaboissier, Francis Poulat, Richard R Behringer, Robin Lovell-Badge, et Blanche Capel. 2006. « Fgf9 and Wnt4 Act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination ». *PLoS Biology* 4 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040187>.
- Kimura, Tohru, Toshinobu Nakamura, Kazushige Murayama, Hiroki Umehara, Noriko Yamano, Shoko Watanabe, Makoto M. Taketo, et Toru Nakano. 2006. « The stabilization of β -catenin leads to impaired primordial germ cell development via aberrant cell cycle progression ». *Developmental Biology* 300 (2): 545-53. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.038>.
- Kinzler, Kenneth W, et Bert Vogelstein. 1996. « Lessons from Hereditary Colorectal Cancer ». *Cell* 87 (2): 159-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81333-1).
- Kitajima, Keiko, Shinya Oki, Yasuyuki Ohkawa, Tomoyuki Sumi, et Chikara Meno. 2013. « Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos ». *Developmental Biology* 380 (2): 222-32. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.05.011>.
- Kluin, Ph. M., M. F. Kramer, et D. G. Rooij. 1982. « Spermatogenesis in the Immature Mouse Proceeds Faster than in the Adult ». *International Journal of Andrology* 5 (3): 282-94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1982.tb00257.x>.
- Knaut, Holger, Christian Werz, Robert Geisler, et Christiane Nüsslein-Volhard. 2003. « A Zebrafish Homologue of the Chemokine Receptor Cxcr4 Is a Germ-Cell Guidance Receptor ». *Nature* 421 (6920): 279-82. <https://doi.org/10.1038/nature01338>.
- Knower, Kevin C., Sabine Kelly, Louisa M. Ludbrook, Stefan Bagheri-Fam, Helena Sim, Pascal Bernard, Ryohei Sekido, Robin Lovell-Badge, et Vincent R. Harley. 2011. « Failure of SOX9 Regulation in 46XY Disorders of Sex Development with SRY, SOX9 and SF1 Mutations ». *PLoS ONE* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017751>.
- Kocer, Ayhan, Iris Pinheiro, Maëlle Pannetier, Lauriane Renault, Pietro Parma, Orietta Radi, Kyung-Ah Kim, Giovanna Camerino, et Eric Pailhoux. 2008. « R-Spondin1 and FOXL2 Act into Two Distinct Cellular Types during Goat Ovarian Differentiation ». *BMC Developmental Biology* 8 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-36>.
- Kocer, Ayhan, Judith Reichmann, Diana Best, et Ian R. Adams. 2009. « Germ Cell Sex Determination in Mammals ». *Molecular Human Reproduction* 15 (4): 205. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap008>.
- Koo, Bon-Kyoung, Maureen Spit, Ingrid Jordens, Teck Y. Low, Daniel E. Stange, Marc van de Wetering, Johan H. van Es, et al. 2012. « Tumour Suppressor RNF43 Is a Stem-Cell E3 Ligase That Induces Endocytosis of Wnt Receptors ». *Nature* 488 (7413): 665-69. <https://doi.org/10.1038/nature11308>.
- Koopman, Peter, John Gubbay, Jérôme Collignon, et Robin Lovell-Badge. 1989. « Zfy Gene Expression Patterns Are Not Compatible with a Primary Role in Mouse Sex Determination ». *Nature* 342 (6252): 940-42. <https://doi.org/10.1038/342940a0>.

- Koopman, Peter, John Gubbay, Nigel Vivian, Peter Goodfellow, et Robin Lovell-Badge. 1991. « Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry ». *Nature* 351 (6322): 117-21. <https://doi.org/10.1038/351117a0>.
- Korf, Bruce R. 2017. « Chapter 16 - Introduction to Human Genetics* ». In *Clinical and Translational Science (Second Edition)*, édité par David Robertson et Gordon H. Williams, 281-311. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802101-9.00016-8>.
- Korinek, Vladimir, Nick Barker, Petra Moerer, Elly van Donselaar, Gerwin Huls, Peter J. Peters, et Hans Clevers. 1998. « Depletion of Epithelial Stem-Cell Compartments in the Small Intestine of Mice Lacking Tcf-4 ». *Nature Genetics* 19 (4): 379-83. <https://doi.org/10.1038/1270>.
- Korinek, Vladimir, Nick Barker, Patrice J. Morin, Dick van Wichen, Roel de Weger, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein, et Hans Clevers. 1997. « Constitutive Transcriptional Activation by a β -Catenin-Tcf Complex in APC^{-/-} Colon Carcinoma ». *Science* 275 (5307): 1784-87. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1784>.
- Korkut, Ceren, Bulent Ataman, Preethi Ramachandran, James Ashley, Romina Barria, Norberto Gherbesi, et Vivian Budnik. 2009. « Trans-Synaptic Transmission of Vesicular Wnt Signals through Evi/Wntless ». *Cell* 139 (2): 393-404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.051>.
- Koshimizu, U., T. Taga, M. Watanabe, M. Saito, Y. Shirayoshi, T. Kishimoto, et N. Nakatsuji. 1996. « Functional Requirement of Gp130-Mediated Signaling for Growth and Survival of Mouse Primordial Germ Cells in Vitro and Derivation of Embryonic Germ (EG) Cells ». *Development* 122 (4): 1235-42.
- Koshimizu, Uichi, Miho Watanabe, et Norio Nakatsuji. 1995. « Retinoic Acid Is a Potent Growth Activator of Mouse Primordial Germ Cells in Vitro ». *Developmental Biology* 168 (2): 683-85. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1113>.
- Koubova, J., D. B. Menke, Q. Zhou, B. Capel, M. D. Griswold, et D. C. Page. 2006. « Retinoic Acid Regulates Sex-Specific Timing of Meiotic Initiation in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (8): 2474-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510813103>.
- Kramps, Thomas, Oliver Peter, Erich Brunner, Denise Nellen, Barbara Froesch, Sandipan Chatterjee, Maximilien Murone, Stephanie Züllig, et Konrad Basler. 2002. « Wnt/Wingless Signaling Requires BCL9/Legless-Mediated Recruitment of Pygopus to the Nuclear β -Catenin-TCF Complex ». *Cell* 109 (1): 47-60. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00679-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00679-7).
- Kreidberg, Jordan A., Hannu Sariola, Janet M. Loring, Masahiro Maeda, Jerry Pelletier, David Housman, et Rudolf Jaenisch. 1993. « WT-1 is required for early kidney development ». *Cell* 74 (4): 679-91. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90515-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90515-R).
- Krentz, Anthony D., Mark W. Murphy, Aaron L. Sarver, Michael D. Griswold, Vivian J. Bardwell, et David Zarkower. 2011. « DMRT1 Promotes Oogenesis by Transcriptional Activation of Stra8 in the Mammalian Fetal Ovary ». *Developmental Biology* 356 (1): 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.658>.
- Krupnik, Valery E., John D. Sharp, Chian Jiang, Keith Robison, Troy W. Chickering, Lakshmi Amaravadi, Diane E. Brown, et al. 1999. « Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family ». *Gene* 238 (2): 301-13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00365-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00365-0).
- Kubo, Naoki, Hidehiro Toh, Kenjiro Shirane, Takayuki Shirakawa, Hisato Kobayashi, Tetsuya Sato, Hidetoshi Sone, et al. 2015. « DNA Methylation and Gene Expression Dynamics during Spermatogonial Stem Cell Differentiation in the Early Postnatal Mouse Testis ». *BMC Genomics* 16 (1): 624. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1833-5>.
- Kühl, Michael, Laird C Sheldahl, Maiyon Park, Jeffrey R Miller, et Randall T Moon. 2000. « The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape ». *Trends in Genetics* 16 (7): 279-83. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02028-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02028-X).
- Kumar, Deepti L., et Tony DeFalco. 2018. « A Perivascular Niche for Multipotent Progenitors in the Fetal Testis ». *Nature Communications* 9 (1): 4519. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06996-3>.
- Kumar, Sandeep, Christina Chatzi, Thomas Brade, Thomas J. Cunningham, Xianling Zhao, et Gregg Duester. 2011. « Sex-Specific Timing of Meiotic Initiation Is Regulated by Cyp26b1 Independent of Retinoic Acid Signalling ». *Nature Communications* 2 (1): 151. <https://doi.org/10.1038/ncomms1136>.
- Kurimoto, Kazuki, Yukihiko Yabuta, Yasuhide Ohinata, Mayo Shigetani, Kaori Yamanaka, et Mitunori Saitou. 2008. « Complex Genome-Wide Transcription Dynamics Orchestrated by Blimp1 for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Genes & Development* 22 (12): 1617-35. <https://doi.org/10.1101/gad.1649908>.
- Kusserow, Arne, Kevin Pang, Carsten Sturm, Martina Hrouda, Jan Lentfer, Heiko A. Schmidt, Ulrich Technau, et al. 2005. « Unexpected Complexity of the Wnt Gene Family in a Sea Anemone ». *Nature* 433 (7022): 156-60. <https://doi.org/10.1038/nature03158>.

- La Sala, Gina, Donatella Farini, et Massimo De Felici. 2010. « Rapid estrogen signalling in mouse primordial germ cells ». *Experimental Cell Research* 316 (10): 1716-27. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.03.024>.
- Lau, Wim BM de, Berend Snel, et Hans C Clevers. 2012. « The R-spondin protein family ». *Genome Biology* 13 (3): 242. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-242>.
- Lau, Wim de, Weng Chuan Peng, Piet Gros, et Hans Clevers. 2014. « The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength ». *Genes & Development* 28 (4): 305-16. <https://doi.org/10.1101/gad.235473.113>.
- Lau, Yun-Fai Chris, et Yunmin Li. 2009. « The human and mouse sex-determining SRY genes repress the Rspol/ β -catenin signaling ». *Journal of Genetics and Genomics* 36 (4): 193-202. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60107-1](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60107-1).
- Lavery, Rowena, A-A Chassot, Eva Pauper, Elodie P. Gregoire, Muriel Klopfenstein, Dirk G. de Rooij, Manuel Mark, Andreas Schedl, Norbert B. Ghyselinck, et Marie-Christine Chaboissier. 2012. « Testicular Differentiation Occurs in Absence of R-spondin1 and Sox9 in Mouse Sex Reversals ». *PLoS Genetics* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003170>.
- Lawson, K. A., et W. J. Hage. 1994. « Clonal Analysis of the Origin of Primordial Germ Cells in the Mouse ». *Ciba Foundation Symposium* 182: 68-84; discussion 84-91.
- Lawson, Kirstie A., N. Ray Dunn, Bernard A.J. Roelen, Laura M. Zeinstra, Angela M. Davis, Christopher V.E. Wright, Jeroen P.W.F.M. Korving, et Brigid L.M. Hogan. 1999. « Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo ». *Genes & Development* 13 (4): 424-36.
- Le Bouffant, R., M. J. Guerquin, C. Duquenne, N. Frydman, H. Coffigny, V. Rouiller-Fabre, R. Frydman, R. Habert, et G. Livera. 2010. « Meiosis Initiation in the Human Ovary Requires Intrinsic Retinoic Acid Synthesis ». *Human Reproduction* 25 (10): 2579-90. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq195>.
- Le Bouffant, R., B. Souquet, N. Duval, C. Duquenne, R. Herve, N. Frydman, B. Robert, R. Habert, et G. Livera. 2011. « Msx1 and Msx2 Promote Meiosis Initiation ». *Development* 138 (24): 5393-5402. <https://doi.org/10.1242/dev.068452>.
- Leclère, Lucas, Muriel Jager, Carine Barreau, Patrick Chang, Hervé Le Guyader, Michaël Manuel, et Evelyn Houliston. 2012. « Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian *Clytia* ». *Developmental Biology* 364 (2): 236-48. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.01.018>.
- Lee, Ethan, Adrian Salic, Roland Krüger, Reinhart Heinrich, et Marc W Kirschner. 2003. « The Roles of APC and Axin Derived from Experimental and Theoretical Analysis of the Wnt Pathway ». *PLoS Biology* 1 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000010>.
- Lee, Hyunjoon J., Dorothy E. Pazin, Ravi S. Kahlon, Stephanie M. Correa, et Kenneth H. Albrecht. 2009. « Novel markers of early ovarian pre-granulosa cells are expressed in an Sry-like pattern ». *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 238 (4): 812-25. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21902>.
- Lee, Jiyoung, Kimiko Inoue, Ryuichi Ono, Narumi Ogonuki, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino, Atsuo Ogura, et Fumitoshi Ishino. 2002. « Erasing Genomic Imprinting Memory in Mouse Clone Embryos Produced from Day 11.5 Primordial Germ Cells ». *Development (Cambridge, England)* 129 (8): 1807-17.
- Lehti, Mari S, et Anu Sironen. 2017. « Formation and Function of Sperm Tail Structures in Association with Sperm Motility Defects† ». *Biology of Reproduction* 97 (4): 522-36. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox096>.
- Leitch, Harry G., Kirsten R. McEwen, Aleksandra Turp, Vesela Encheva, Tom Carroll, Nils Grabole, William Mansfield, et al. 2013. « Naïve pluripotency is associated with global DNA hypomethylation ». *Nature structural & molecular biology* 20 (3): 311-16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2510>.
- Li, Yunmin, Ming Zheng, et Yun-Fai Chris Lau. 2014. « The Sex-Determining Factors SRY and SOX9 Regulate Similar Target Genes and Promote Testis Cord Formation during Testicular Differentiation ». *Cell Reports* 8 (3): 723-33. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.055>.
- Liang, Huiling, Qin Chen, Andrew H. Coles, Stephen J. Anderson, German Pihan, Allan Bradley, Rachel Gerstein, Roland Jurecic, et Stephen N. Jones. 2003. « Wnt5a Inhibits B Cell Proliferation and Functions as a Tumor Suppressor in Hematopoietic Tissue ». *Cancer Cell* 4 (5): 349-60. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00268-X).
- Liat, Lerner-Geva, Rabinovici Jaron, Olmer Liraz, Blumstein Tzvia, Mashlach Shlomo, et Lunenfeld Bruno. 2012. « Are infertility treatments a potential risk factor for cancer development? Perspective of 30 years of follow-up ». *Gynecological Endocrinology* 28 (10): 809-14. <https://doi.org/10.3109/09513590.2012.671391>.
- Lickert, H., C. Domon, G. Huls, C. Wehrle, I. Duluc, H. Clevers, B. I. Meyer, J. N. Freund, et R. Kemler. 2000. « Wnt/(Beta)-Catenin Signaling Regulates the Expression of the Homeobox Gene *Cdx1* in Embryonic Intestine ». *Development* 127 (17): 3805-13.
- Lim, Xinhong, Si Hui Tan, Ka Lou Yu, Sophia Beng Hui Lim, et Roeland Nusse. 2016. « Axin2 marks quiescent hair follicle bulge stem cells that are maintained by autocrine Wnt/ β -catenin signaling ». *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (11): E1498-1505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601599113>.
- Lin, Xinhua. 2004. « Functions of Heparan Sulfate Proteoglycans in Cell Signaling during Development ». *Development* 131 (24): 6009-21. <https://doi.org/10.1242/dev.01522>.
- Lindsley, R. Coleman, Jennifer G. Gill, Michael Kyba, Theresa L. Murphy, et Kenneth M. Murphy. 2006. « Canonical Wnt Signaling Is Required for Development of Embryonic Stem Cell-Derived Mesoderm ». *Development (Cambridge, England)* 133 (19): 3787-96. <https://doi.org/10.1242/dev.02551>.
- Liu, C.-F., N. Bingham, K. Parker, et H. H.-C. Yao. 2008. « Sex-Specific Roles of β -Catenin in Mouse Gonadal Development ». *Human Molecular Genetics* 18 (3): 405-17. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn362>.
- Liu, Chang, Jia Peng, Martin M. Matzuk, et Humphrey H-C Yao. 2015. « Lineage Specification of Ovarian Theca Cells Requires Multi-Cellular Interactions via Oocyte and Granulosa Cells ». *Nature communications* 6 (avril): 6934. <https://doi.org/10.1038/ncomms7934>.
- Liu, Chia-Feng, Keith Parker, et Humphrey H.-C. Yao. 2010. « WNT4/ β -Catenin Pathway Maintains Female Germ Cell Survival by Inhibiting Activin β B in the Mouse Fetal Ovary ». *PLoS ONE* 5 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010382>.
- Liu, Chunming, Yiming Li, Mikhail Semenov, Chun Han, Gyeong-Hun Baeg, Yi Tan, Zhuohua Zhang, Xinhua Lin, et Xi He. 2002. « Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism ». *Cell* 108 (6): 837-47. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00685-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00685-2).
- Liu, Pentao, Maki Wakamiya, Martin J. Shea, Urs Albrecht, Richard R. Behringer, et Allan Bradley. 1999. « Requirement for Wnt3 in Vertebrate Axis Formation ». *Nature Genetics* 22 (4): 361-65. <https://doi.org/10.1038/11932>.
- Liu, Wanguo, Xiangyang Dong, Ming Mai, Ratnam S. Seelan, Ken Taniguchi, Kausilia K. Krishnadath, Kevin C. Halling, et al. 2000. « Mutations in AXIN2 Cause Colorectal Cancer with Defective Mismatch Repair by Activating β -Catenin/TCF Signalling ». *Nature Genetics* 26 (2): 146-47. <https://doi.org/10.1038/79859>.
- Logan, Catriona Y., et Roel Nusse. 2004. « The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (1): 781-810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>.
- Loh, Kyle M., Renée van Amerongen, et Roel Nusse. 2016. « Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals ». *Developmental Cell* 38 (6): 643-55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.011>.
- Łos, Marek J., Aleksandra Skubis, et Saeid Ghavami. 2019. « Chapter 2 - Stem Cells ». In *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, édité par Marek J. Łos, Andrzej Hudecki, et Emilia Wiecheć, 5-16. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00002-2>.
- Losick, Vicki P., Lucy X. Morris, Donald T. Fox, et Allan Spradling. 2011. « Drosophila Stem Cell Niches: A Decade of Discovery Suggests a Unified View of Stem Cell Regulation ». *Developmental Cell* 21 (1): 159-71. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.018>.
- Ludbrook, Louisa M., Pascal Bernard, Stefan Bagheri-Fam, Janelle Ryan, Ryohei Sekido, Dagmar Wilhelm, Robin Lovell-Badge, et Vincent R. Harley. 2012. « Excess DAX1 Leads to XY Ovotesticular Disorder of Sex Development (DSD) in Mice by Inhibiting Steroidogenic Factor-1 (SF1) Activation of the Testis Enhancer of SRY-Box-9 (Sox9) ». *Endocrinology* 153 (4): 1948-58. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1428>.
- Luo, Xunrong, Yayoi Ikeda, et Keith L. Parker. 1994. « A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation ». *Cell* 77 (4): 481-90. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90211-9).
- Lustig, Barbara, Boris Jerchow, Martin Sachs, Sigrid Weiler, Torsten Pietsch, Uwe Karsten, Marc van de Wetering, et al. 2002. « Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (4): 1184-93. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1184-1193.2002>.
- Lyuksytova, A. I. 2003. « Anterior-Posterior Guidance of Commissural Axons by Wnt-Frizzled Signaling ». *Science* 302 (5652): 1984-88. <https://doi.org/10.1126/science.1089610>.
- Maatouk, Danielle M., Leo DiNapoli, Ashley Alvers, Keith L. Parker, Makoto M. Taketo, et Blanche Capel. 2008. « Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal ». *Human Molecular Genetics* 17 (19): 2949-55. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn193>.
- Maatouk, Danielle M., Lindsey Mork, A-A Chassot, Chaboissier Marie-Christine, et Blanche Capel. 2013. « Disruption of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa cells in the perinatal Wnt4 mutant ovary ». *Developmental biology* 383 (2): 295-306. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.08.026>.
- Maatouk, Danielle M., Lindsey Mork, Ashley Hinson, Akio Kobayashi, Andrew P. McMahon, et Blanche Capel. 2012. « Germ Cells Are Not Required to Establish the Female Pathway in Mouse Fetal Gonads ». *PLoS ONE* 7 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047238>.

- MacDonald, Bryan T., Keiko Tamai, et Xi He. 2009. « Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases ». *Developmental cell* 17 (1): 9-26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>.
- Machev, Nadejda, Guy Fuhrmann, et Stéphane Viville. 2004. « Ontogenèse des cellules germinales primordiales ». *médecine/sciences* 20 (12): 1091-95. <https://doi.org/10.1051/medsci/200420121091>.
- MacLean, Glenn, Hui Li, Daniel Metzger, Pierre Chambon, et Martin Petkovich. 2007. « Apoptotic Extinction of Germ Cells in Testes of Cyp26b1 Knockout Mice ». *Endocrinology* 148 (10): 4560-67. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0492>.
- Magnúsdóttir, Erna, et M. Azim Surani. 2014. « How to Make a Primordial Germ Cell ». *Development* 141 (2): 245-52. <https://doi.org/10.1242/dev.098269>.
- Mahabaleshwar, Harsha, Bijan Boldajipour, et Erez Raz. 2008. « Killing the Messenger: The Role of CXCR7 in Regulating Primordial Germ Cell Migration ». *Cell Adhesion & Migration* 2 (2): 69.
- Mahakali Zama, Aparna, F. Parker Hudson, et Mary A. Bedell. 2005. « Analysis of Hypomorphic KitlSl Mutants Suggests Different Requirements for KITL in Proliferation and Migration of Mouse Primordial Germ Cells ». *Biology of Reproduction* 73 (4): 639-47. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.042846>.
- Malki, Safia, Serge Nef, Cécile Notarnicola, Laurie Thevenet, Stéphane Gasca, Catherine Méjean, Philippe Berta, Francis Poulat, et Brigitte Boizet-Bonhoure. 2005. « Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation ». *The EMBO Journal* 24 (10): 1798-1809. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600660>.
- Mandel, Hannah, Revital Shemer, Zvi U. Borochoowitz, Marina Okopnik, Carlos Knopf, Margarita Indelman, Arie Drugan, et al. 2008. « SERKAL Syndrome: An Autosomal-Recessive Disorder Caused by a Loss-of-Function Mutation in WNT4 ». *The American Journal of Human Genetics* 82 (1): 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.08.005>.
- Manuylov, N. L., F. O. Smagulova, L. Leach, et S. G. Tevosian. 2008. « Ovarian Development in Mice Requires the GATA4-FOG2 Transcription Complex ». *Development* 135 (22): 3731-43. <https://doi.org/10.1242/dev.024653>.
- Mao, Bingyu, Wei Wu, Gary Davidson, Joachim Marhold, Mingfa Li, Bernard M. Mechler, Hajo Delius, et al. 2002. « Kremen Proteins Are Dickkopf Receptors That Regulate Wnt/ β -Catenin Signalling ». *Nature* 417 (6889): 664-67. <https://doi.org/10.1038/nature756>.
- Maraia, Richard, Howard M. Saal, et Damrong Wangsa. 1991. « A Chromosome 17q de Novo Paracentric Inversion in a Patient with Campomelic Dysplasia; Case Report and Etiologic Hypothesis ». *Clinical Genetics* 39 (6): 401-8. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1991.tb03050.x>.
- Mark, M., H. Jacobs, M. Oulad-Abdelghani, C. Dennefeld, B. Feret, N. Vernet, C.-A. Codreanu, P. Chambon, et N. B. Ghyselinck. 2008. « STRA8-Deficient Spermatocytes Initiate, but Fail to Complete, Meiosis and Undergo Premature Chromosome Condensation ». *Journal of Cell Science* 121 (19): 3233-42. <https://doi.org/10.1242/jcs.035071>.
- Mark, Manuel, Norbert B. Ghyselinck, et Pierre Chambon. 2006. « FUNCTION OF RETINOIC NUCLEAR RECEPTORS: Lessons from Genetic and Pharmacological Dissections of the Retinoic Acid Signaling Pathway During Mouse Embryogenesis ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 46 (1): 451-80. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141156>.
- Mark, Manuel, Marius Teletin, Nadège Vernet, et Norbert B. Ghyselinck. 2015. « Role of Retinoic Acid Receptor (RAR) Signaling in Post-Natal Male Germ Cell Differentiation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849 (2): 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.019>.
- Matson, Clinton K., Mark W. Murphy, Aaron L. Sarver, Michael D. Griswold, Vivian J. Bardwell, et David Zarkower. 2011. « DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis ». *Nature* 476 (7358): 101-4. <https://doi.org/10.1038/nature10239>.
- Mayère, Chloé, Yasmine Neirijnck, Pauline Sararols, Isabelle Stévant, Françoise Kühne, Anne Amandine Chassot, Marie-Christine Chaboissier, Emmanouil T. Dermitzakis, et Serge Nef. 2019. « Single-Cell Transcriptomic Reveals Temporal Dynamics of Critical Regulators of Germ Cell Fate during Mouse Sex Determination ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/747279>.
- Mazaud, S., E. Oréal, C. J. Guigon, D. Carré-Eusèbe, et S. Magre. 2002. « Lhx9 expression during gonadal morphogenesis as related to the state of cell differentiation ». *Gene Expression Patterns* 2 (3): 373-77. [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(02\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(02)00050-9).
- McCoshen, DJ, et JA McCallion. 1975. « A Study of the Primordial Germ Cells during Their Migratory Phase in Steel Mutant Mice. » 1975. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1170085/>.
- McCrea, P. D., C. W. Turck, et B. Gumbiner. 1991. « A Homolog of the Armadillo Protein in Drosophila (Plakoglobin) Associated with E-Cadherin ». *Science* 254 (5036): 1359-61. <https://doi.org/10.1126/science.1962194>.
- McDonald, Terry, Ruiping Wang, Wendy Bailey, Guochun Xie, Fang Chen, C. Thomas Caskey, et Qingyun Liu. 1998. « Identification and Cloning of an Orphan G Protein-Coupled Receptor of the Glycoprotein

- Hormone Receptor Subfamily ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247 (2): 266-70. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8774>.
- McGee, Elizabeth A., et Aaron J. W. Hsueh. 2000. « Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles ¹ ». *Endocrine Reviews* 21 (2): 200-214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>.
- McLaren, A., et M. Buehr. 1990. « Development of Mouse Germ Cells in Cultures of Fetal Gonads ». *Cell Differentiation and Development: The Official Journal of the International Society of Developmental Biologists* 31 (3): 185-95.
- McLaren, A., et D. Southee. 1997. « Entry of Mouse Embryonic Germ Cells into Meiosis ». *Developmental Biology* 187 (1): 107-13. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8584>.
- Medeiros, Lea A., Lucas M. Dennis, Mark E. Gill, Hristo Houbavii, Styliani Markoulaki, Dongdong Fu, Amy C. White, et al. 2011. « Mir-290–295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (34): 14163-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111241108>.
- Merchant-Larios, H., N. Moreno-Mendoza, et M. Buehr. 1993. « The Role of the Mesonephros in Cell Differentiation and Morphogenesis of the Mouse Fetal Testis ». *The International Journal of Developmental Biology* 37 (3): 407-15.
- Merrill, B. J., U. Gat, R. DasGupta, et E. Fuchs. 2001. « Tcf3 and Lef1 Regulate Lineage Differentiation of Multipotent Stem Cells in Skin ». *Genes & Development* 15 (13): 1688-1705. <https://doi.org/10.1101/gad.891401>.
- Mieszczanek, Juliusz, Marc de la Roche, et Mariann Bienz. 2008. « A role of Pygopus as an anti-repressor in facilitating Wnt-dependent transcription ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (49): 19324-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806098105>.
- Mitsunaga, Kanae, Kimi Araki, Hirofumi Mizusaki, Ken-ichirou Morohashi, Kyoko Haruna, Naomi Nakagata, Vincent Giguère, Ken-ichi Yamamura, et Kuniya Abe. 2004. « Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR- β results in reduction of germ cell number in mouse embryos ». *Mechanisms of Development* 121 (3): 237-46. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.01.006>.
- Miyamoto, N., M. Yoshida, S. Kuratani, I. Matsuo, et S. Aizawa. 1997. « Defects of Urogenital Development in Mice Lacking Emx2 ». *Development* 124 (9): 1653-64.
- Miyamoto, Yoko, Hiroaki Taniguchi, Frédéric Hamel, David W Silversides, et Robert S Viger. 2008. « A GATA4/WT1 Cooperation Regulates Transcription of Genes Required for Mammalian Sex Determination and Differentiation ». *BMC Molecular Biology* 9 (1): 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-44>.
- Miyauchi, Hidetaka, Hiroshi Ohta, So Nagaoka, Fumio Nakaki, Kotaro Sasaki, Katsuhiko Hayashi, Yukihiro Yabuta, Tomonori Nakamura, Takuya Yamamoto, et Mitinori Saitou. 2017. « Bone Morphogenetic Protein and Retinoic Acid Synergistically Specify Female Germ-cell Fate in Mice ». *The EMBO Journal* 36 (21): 3100-3119. <https://doi.org/10.15252/embj.201796875>.
- Molenaar, Miranda, Marc van de Wetering, Mariette Oosterwegel, Josi Peterson-Maduro, Susan Godsave, Vladimir Korinek, Jeroen Roose, Olivier Destrée, et Hans Clevers. 1996. « XTcf-3 Transcription Factor Mediates β -Catenin-Induced Axis Formation in Xenopus Embryos ». *Cell* 86 (3): 391-99. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80112-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80112-9).
- Molyneaux, Kathleen A., Jim Stallock, Kyle Schaible, et Christopher Wylie. 2001. « Time-Lapse Analysis of Living Mouse Germ Cell Migration ». *Developmental Biology* 240 (2): 488-98. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0436>.
- Molyneaux, Kathleen A, Ying Wang, Kyle Schaible, et Chris Wylie. 2004. « Transcriptional profiling identifies genes differentially expressed during and after migration in murine primordial germ cells ». *Gene Expression Patterns* 4 (2): 167-81. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2003.09.002>.
- Molyneaux, Kathleen A., Hélène Zinszner, Prabhat S. Kunwar, Kyle Schaible, Jürg Stebler, Mary Jean Sunshine, William O'Brien, et al. 2003. « The Chemokine SDF1/CXCL12 and Its Receptor CXCR4 Regulate Mouse Germ Cell Migration and Survival ». *Development* 130 (18): 4279-86. <https://doi.org/10.1242/dev.00640>.
- Moniot, Brigitte, Faustine Declosmenil, Francisco Barrionuevo, Gerd Scherer, Kosuke Aritake, Safia Malki, Laetitia Marzi, et al. 2009. « The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation ». *Development (Cambridge, England)* 136 (11): 1813-21. <https://doi.org/10.1242/dev.032631>.
- Monk, M., M. Boubelik, et S. Lehnert. 1987. « Temporal and Regional Changes in DNA Methylation in the Embryonic, Extraembryonic and Germ Cell Lineages during Mouse Embryo Development ». *Development* 99 (3): 371-82.
- Morgan, Hugh D., Wendy Dean, Heather A. Coker, Wolf Reik, et Svend K. Petersen-Mahrt. 2004. « Activation-Induced Cytidine Deaminase Deaminates 5-Methylcytosine in DNA and Is Expressed in Pluripotent

- Tissues: IMPLICATIONS FOR EPIGENETIC REPROGRAMMING ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 52353-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407695200>.
- Morin, Patrice J., Andrew B. Sparks, Vladimir Korinek, Nick Barker, Hans Clevers, Bert Vogelstein, et Kenneth W. Kinzler. 1997. « Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC ». *Science* 275 (5307): 1787-90. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1787>.
- Mork, Lindsey, Danielle M. Maatouk, Jill A. McMahon, Jin Jin Guo, Pumin Zhang, Andrew P. McMahon, et Blanche Capel. 2012. « Temporal Differences in Granulosa Cell Specification in the Ovary Reflect Distinct Follicle Fates in Mice ». *Biology of Reproduction* 86 (2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095208>.
- Muramatsu, Masamichi, Kazuo Kinoshita, Sidonia Fagarasan, Shuichi Yamada, Yoichi Shinkai, et Tasuku Honjo. 2000. « Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme ». *Cell* 102 (5): 553-63. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00078-7).
- Murdoch, Barbara, Kristin Chadwick, Matthew Martin, Farbod Shojaei, Kavita V. Shah, Lisa Gallacher, Randall T. Moon, et Mickie Bhatia. 2003. « Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (6): 3422-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.0130233100>.
- Murdoch, Jennifer N., Kit Doudney, Caroline Paternotte, Andrew J. Copp, et Philip Stanier. 2001. « Severe Neural Tube Defects in the Loop-Tail Mouse Result from Mutation of Lpp1, a Novel Gene Involved in Floor Plate Specification ». *Human Molecular Genetics* 10 (22): 2593-2601. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.22.2593>.
- Mustata, Roxana C., Tom Van Loy, Anne Lefort, Frédérick Libert, Sandra Strollo, Gilbert Vassart, et Marie-Isabelle Garcia. 2011. « Lgr4 Is Required for Paneth Cell Differentiation and Maintenance of Intestinal Stem Cells Ex Vivo ». *EMBO Reports* 12 (6): 558-64. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.52>.
- Muzumdar, Mandar Deepak, Bosiljka Tasic, Kazunari Miyamichi, Ling Li, et Liqun Luo. 2007. « A Global Double-Fluorescent Cre Reporter Mouse ». *Genesis* 45 (9): 593-605. <https://doi.org/10.1002/dvg.20335>.
- Naillat, Florence, Renata Prunskaitė-Hyyryläinen, Ilkka Pietilä, Raija Sormunen, Tiina Jokela, Jingdong Shan, et Seppo J. Vainio. 2010. « Wnt4/5a Signalling Coordinates Cell Adhesion and Entry into Meiosis during Presumptive Ovarian Follicle Development ». *Human Molecular Genetics* 19 (8): 1539-50. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq027>.
- Naillat, Florence, Ville Veikkolainen, Ilkka Miinalainen, Petra Sipilä, Matti Poutanen, Klaus Elenius, et Seppo J. Vainio. 2014. « ErbB4, a Receptor Tyrosine Kinase, Coordinates Organization of the Seminiferous Tubules in the Developing Testis ». *Molecular Endocrinology* 28 (9): 1534-46. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1244>.
- Nakamura, A., R. Amikura, M. Mukai, S. Kobayashi, et P. F. Lasko. 1996. « Requirement for a Noncoding RNA in Drosophila Polar Granules for Germ Cell Establishment ». *Science (New York, N.Y.)* 274 (5295): 2075-79. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2075>.
- Nakamura, Toshinobu, Yoshikazu Arai, Hiroki Umehara, Masaaki Masuhara, Tohru Kimura, Hisaaki Taniguchi, Toshihiro Sekimoto, et al. 2007. « PGC7/Stella Protects against DNA Demethylation in Early Embryogenesis ». *Nature Cell Biology* 9 (1): 64-71. <https://doi.org/10.1038/ncb1519>.
- Nam, Ju-Suk, Taryn J. Turcotte, Peter F. Smith, Sangdun Choi, et Jeong Kyo Yoon. 2006. « Mouse Cristin/R-Spondin Family Proteins Are Novel Ligands for the Frizzled 8 and LRP6 Receptors and Activate β -Catenin-Dependent Gene Expression ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (19): 13247-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508324200>.
- Nef, Serge, Sunita Verma-Kurvari, Jussi Merenmies, Jean-Dominique Vassalli, Argiris Efstratiadis, Domenico Accili, et Luis F. Parada. 2003. « Testis Determination Requires Insulin Receptor Family Function in Mice ». *Nature* 426 (6964): 291. <https://doi.org/10.1038/nature02059>.
- Nel-Themaat, Liesl, Chuan-Wei Jang, M. David Stewart, Haruhiko Akiyama, Robert S. Viger, et Richard R. Behringer. 2011. « Sertoli Cell Behaviors in Developing Testis Cords and Postnatal Seminiferous Tubules of the Mouse ». *Biology of Reproduction* 84 (2): 342-50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086900>.
- Ng, Annie, Shawna Tan, Gurmit Singh, Pamela Rizk, Yada Swathi, Tuan Zea Tan, Ruby Yun-Ju Huang, Marc Leushacke, et Nick Barker. 2014. « Lgr5 Marks Stem/Progenitor Cells in Ovary and Tubal Epithelia ». *Nature Cell Biology* 16 (8): 745-57. <https://doi.org/10.1038/ncb3000>.
- Nichols, Jennifer, et Austin Smith. 2011. « The Origin and Identity of Embryonic Stem Cells ». *Development* 138 (1): 3-8. <https://doi.org/10.1242/dev.050831>.
- Nie, Kui, Mario Gomez, Pablo Landgraf, Jose-Francisco Garcia, Yifang Liu, Leonard H.C. Tan, Amy Chadburn, Thomas Tuschl, Daniel M. Knowles, et Wayne Tam. 2008. « MicroRNA-Mediated Down-Regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg Cells: A Potential Pathogenetic Lesion in Hodgkin

- Lymphomas ». *The American Journal of Pathology* 173 (1): 242-52. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080009>.
- Niehrs, Christof. 2012. « The Complex World of WNT Receptor Signalling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (12): 767-79. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>.
- Niehrs, Christof, et Sergio P Acebron. 2012. « Mitotic and mitogenic Wnt signalling ». *The EMBO Journal* 31 (12): 2705-13. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.124>.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, Y. Miyoshi, Y. Miki, H. Ando, A. Horii, K. Koyama, J. Utsunomiya, S. Baba, et P. Hedge. 1991. « Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Cancer Patients ». *Science* 253 (5020): 665-69. <https://doi.org/10.1126/science.1651563>.
- Niwa, Hitoshi. 2007. « Open Conformation Chromatin and Pluripotency ». *Genes & Development* 21 (21): 2671-76. <https://doi.org/10.1101/gad.1615707>.
- Niwa, Hitoshi, Jun-ichi Miyazaki, et Austin G. Smith. 2000. « Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells ». *Nature Genetics* 24 (4): 372-76. <https://doi.org/10.1038/74199>.
- Noordermeer, Jasprien, John Klingensmith, Norbert Perrimon, et Roel Nusse. 1994. « Dishevelled and Armadillo Act in the Wingless Signalling Pathway in Drosophila ». *Nature* 367 (6458): 80-83. <https://doi.org/10.1038/367080a0>.
- Nucera, Silvia, Daniela Biziato, et Michele De Palma. 2011. « The Interplay between Macrophages and Angiogenesis in Development, Tissue Injury and Regeneration ». *International Journal of Developmental Biology* 55 (4-5): 495-503. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103227sn>.
- O'Bryan, Moira K., Shuji Takada, Claire L. Kennedy, Greg Scott, Shun-ichi Harada, Manas K. Ray, Qunsheng Dai, et al. 2008. « Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility ». *Developmental biology* 316 (2): 359-70. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.01.042>.
- O'Donnell, Liza, Peter K. Nicholls, Moira K. O'Bryan, Robert I. McLachlan, et Peter G. Stanton. 2011. « Spermiation: The Process of Sperm Release ». *Spermatogenesis* 1 (1): 14-35. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525>.
- Ohinata, Yasuhide, Hiroshi Ohta, Mayo Shigeta, Kaori Yamanaka, Teruhiko Wakayama, et Mitunori Saitou. 2009. « A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Cell* 137 (3): 571-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.014>.
- Ohinata, Yasuhide, Bernhard Payer, Dónal O'Carroll, Katia Ancelin, Yukiko Ono, Mitsue Sano, Sheila C. Barton, et al. 2005. « Blimp1 Is a Critical Determinant of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Nature* 436 (7048): 207-13. <https://doi.org/10.1038/nature03813>.
- Ohkawara, Bisei, Andrei Glinka, et Christof Niehrs. 2011. « Rspo3 Binds Syndecan 4 and Induces Wnt/PCP Signaling via Clathrin-Mediated Endocytosis to Promote Morphogenesis ». *Developmental Cell* 20 (3): 303-14. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.006>.
- Ong, Choon Kiat, Chutima Subimerb, Chawalit Pairojkul, Sopit Wongkham, Ioana Cutcutache, Willie Yu, John R. McPherson, et al. 2012. « Exome Sequencing of Liver Fluke-Associated Cholangiocarcinoma ». *Nature Genetics* 44 (6): 690-93. <https://doi.org/10.1038/ng.2273>.
- Ono, Makoto, et Vincent R. Harley. 2013. « Disorders of Sex Development: New Genes, New Concepts ». *Nature Reviews Endocrinology* 9 (2): 79-91. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.235>.
- Oosterhuis, J. Wolter, et Leendert H. J. Looijenga. 2003. « Current Views on the Pathogenesis of Testicular Germ Cell Tumours and Perspectives for Future Research: Highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in Situ and Cancer of the Testis ». *APMIS* 111 (1): 280-89. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1110131.x>.
- . 2005. « Testicular Germ-Cell Tumours in a Broader Perspective ». *Nature Reviews Cancer* 5 (3): 210-22. <https://doi.org/10.1038/nrc1568>.
- Ooyen, Albert van, et Roel Nusse. 1984. « Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact ». *Cell* 39 (1): 233-40. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90209-5).
- Ottolenghi, Chris, Shakib Omari, J. Elias Garcia-Ortiz, Manuela Uda, Laura Crisponi, Antonino Forabosco, Giuseppe Pilia, et David Schlessinger. 2005. « Foxl2 Is Required for Commitment to Ovary Differentiation ». *Human Molecular Genetics* 14 (14): 2053-62. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi210>.
- Ottolenghi, Chris, Emanuele Pelosi, Joseph Tran, Maria Colombino, Eric Douglass, Timur Nedorezov, Antonio Cao, Antonino Forabosco, et David Schlessinger. 2007. « Loss of Wnt4 and Foxl2 Leads to Female-to-Male Sex Reversal Extending to Germ Cells ». *Human Molecular Genetics* 16 (23): 2795-2804. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm235>.
- Oulad-Abdelghani, M. 1996. « Characterization of a Premeiotic Germ Cell-Specific Cytoplasmic Protein Encoded by Stra8, a Novel Retinoic Acid-Responsive Gene ». *The Journal of Cell Biology* 135 (2): 469-77. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.2.469>.

- Page, David C., Rebecca Mosher, Elizabeth M. Simpson, Elizabeth M. C. Fisher, Graeme Mardon, Jonathan Pollack, Barbara McGillivray, Albert de la Chapelle, et Laura G. Brown. 1987. « The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein ». *Cell* 51 (6): 1091-1104. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90595-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90595-2).
- Pailhoux, Eric, Bernard Vigier, Stéphane Chaffaux, Nathalie Servel, Sead Taourit, Jean-Pierre Furet, Marc Fellous, et al. 2001. « A 11.7-Kb Deletion Triggers Intersexuality and Polledness in Goats ». *Nature Genetics* 29 (4): 453. <https://doi.org/10.1038/ng769>.
- Palmer, M. S., A. H. Sinclair, P. Berta, N. A. Ellis, P. N. Goodfellow, N. E. Abbas, et M. Fellous. 1989. « Genetic Evidence That ZFY Is Not the Testis-Determining Factor ». *Nature* 342 (6252): 937-39. <https://doi.org/10.1038/342937a0>.
- Palmer, S. J., et P. S. Burgoyne. 1991a. « XY Follicle Cells in the Ovaries of XO/XY and XO/XY/XYY Mosaic Mice ». *Development* 111 (4): 1017-19.
- . 1991b. « In Situ Analysis of Fetal, Prepuberal and Adult XX—XY Chimaeric Mouse Testes: Sertoli Cells Are Predominantly, but Not Exclusively, XY ». *Development* 112 (1): 265-68.
- Pannetier, Maëlle, Lauriane Renault, Geneviève Jolivet, Corinne Cotinot, et Eric Pailhoux. 2005. « Ovarian-Specific Expression of a New Gene Regulated by the Goat PIS Region and Transcribed by a FOXL2 Bidirectional Promoter ». *Genomics* 85 (6): 715-26. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.02.011>.
- Parma, P., E. Pailhoux, et C. Cotinot. 1999. « Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis of Genes Involved in Gonadal Differentiation in Pigs ». *Biology of Reproduction* 61 (3): 741-48. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.741>.
- Parma, Pietro, Orietta Radi, Valerie Vidal, Marie Christine Chaboissier, Elena Dellambra, Stella Valentini, Liliana Guerra, Andreas Schedl, et Giovanna Camerino. 2006. « R-Spondin1 Is Essential in Sex Determination, Skin Differentiation and Malignancy ». *Nature Genetics* 38 (11): 1304-9. <https://doi.org/10.1038/ng1907>.
- Parrott, Jeff A., et Michael K. Skinner. 2000. « Kit Ligand Actions on Ovarian Stromal Cells: Effects on Theca Cell Recruitment and Steroid Production ». *Molecular Reproduction and Development* 55 (1): 55-64. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200001\)55:1<55::AID-MRD8>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200001)55:1<55::AID-MRD8>3.0.CO;2-L).
- Payer, Bernhard, Mitinori Saitou, Sheila C. Barton, Rosemary Thresher, John P. C. Dixon, Dirk Zahn, William H. Colledge, Mark B. L. Carlton, Toru Nakano, et M. Azim Surani. 2003. « Stella Is a Maternal Effect Gene Required for Normal Early Development in Mice ». *Current Biology* 13 (23): 2110-17. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.11.026>.
- Peifer, M., P. D. McCreac, K. J. Green, E. Wieschaus, et B. M. Gumbiner. 1992. « The Vertebrate Adhesive Junction Proteins Beta-Catenin and Plakoglobin and the Drosophila Segment Polarity Gene Armadillo Form a Multigene Family with Similar Properties ». *The Journal of Cell Biology* 118 (3): 681-91. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.3.681>.
- Peifer, M., C. Rauskolb, M. Williams, B. Riggleman, et E. Wieschaus. 1991. « The Segment Polarity Gene Armadillo Interacts with the Wingless Signaling Pathway in Both Embryonic and Adult Pattern Formation ». *Development* 111 (4): 1029-43.
- Pelosi, Emanuele, Antonino Forabosco, et David Schlessinger. 2011. « Germ cell formation from embryonic stem cells and the use of somatic cell nuclei in oocytes ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1221 (1): 18-26. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05982.x>.
- Peng, Weng Chuan, Wim de Lau, Pramod K. Madoori, Federico Forneris, Joke C. M. Granneman, Hans Clevers, et Piet Gros. 2013. « Structures of Wnt-Antagonist ZNRF3 and Its Complex with R-Spondin 1 and Implications for Signaling ». *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083110>.
- Pepling, Melissa E., et Allan C. Spradling. 2001. « Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles ». *Developmental Biology* 234 (2): 339-51. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>.
- Permeth-Wey, Jennifer, et Thomas A. Sellers. 2009. « Epidemiology of Ovarian Cancer ». In *Cancer Epidemiology: Modifiable Factors*, édité par Mukesh Verma, 413-37. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0_20.
- Pfaffeneder, Toni, Benjamin Hackner, Matthias Truß, Martin Münzel, Markus Müller, Christian A. Deiml, Christian Hagemeyer, et Thomas Carell. 2011. « The Discovery of 5-Formylcytosine in Embryonic Stem Cell DNA ». *Angewandte Chemie International Edition* 50 (31): 7008-12. <https://doi.org/10.1002/anie.201103899>.
- Pilon, N., K. Oh, J.-R. Sylvestre, J. G. A. Savory, et D. Lohnes. 2007. « Wnt Signaling Is a Key Mediator of Cdx1 Expression in Vivo ». *Development* 134 (12): 2315-23. <https://doi.org/10.1242/dev.001206>.
- Pinson, Kathleen I., Jane Brennan, Susan Monkley, Brian J. Avery, et William C. Skarnes. 2000. « An LDL-Receptor-Related Protein Mediates Wnt Signalling in Mice ». *Nature* 407 (6803): 535-38. <https://doi.org/10.1038/35035124>.
- Piprek, Rafal P., Anna Pecio, Katarzyna Laskowska-Kaszub, Malgorzata Kloc, Jacek Z. Kubiak, et Jacek M. Szymura. 2013. « Retinoic Acid Homeostasis Regulates Meiotic Entry in Developing Anuran Gonads

- and in Bidder's Organ through Raldh2 and Cyp26b1 Proteins ». *Mechanisms of Development* 130 (11-12): 613-27. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.09.001>.
- Pitetti, Jean-Luc, Pierre Calvel, Yannick Romero, Béatrice Conne, Vy Truong, Marilena D. Papaioannou, Olivier Schaad, et al. 2013. « Insulin and IGF1 Receptors Are Essential for XX and XY Gonadal Differentiation and Adrenal Development in Mice ». Édité par Humphrey Yao. *PLoS Genetics* 9 (1): e1003160. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003160>.
- Plaks, Vicki, Audrey Brenot, Devon A. Lawson, Jelena Linneman, Eline C. Van Kappel, Karren Wong, Frederic de Sauvage, Ophir D. Klein, et Zena Werb. 2013. « Lgr5 expressing cells are sufficient and necessary for postnatal mammary gland organogenesis ». *Cell reports* 3 (1): 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.017>.
- Polanco, Juan Carlos, Dagmar Wilhelm, Tara-Lynne Davidson, Deon Knight, et Peter Koopman. 2010. « Sox10 Gain-of-Function Causes XX Sex Reversal in Mice: Implications for Human 22q-Linked Disorders of Sex Development ». *Human Molecular Genetics* 19 (3): 506-16. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp520>.
- Popp, Christian, Wendy Dean, Suhua Feng, Shawn J. Cokus, Simon Andrews, Matteo Pellegrini, Steven E. Jacobsen, et Wolf Reik. 2010. « Genome-Wide Erasure of DNA Methylation in Mouse Primordial Germ Cells Is Affected by AID Deficiency ». *Nature* 463 (7284): 1101-5. <https://doi.org/10.1038/nature08829>.
- Probst, Aline V., et Geneviève Almouzni. 2011. « Heterochromatin Establishment in the Context of Genome-Wide Epigenetic Reprogramming ». *Trends in Genetics* 27 (5): 177-85. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.02.002>.
- Proudhon, Charlotte, Rachel Duffié, Sophie Ajjan, Michael Cowley, Julian Iranzo, Guillermo Carbajosa, Heba Saadeh, et al. 2012. « Protection against De Novo Methylation Is Instrumental in Maintaining Parent-of-Origin Methylation Inherited from the Gametes ». *Molecular Cell* 47 (6): 909-20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.010>.
- Quirk, Jeffrey T., Nachimuthu Natarajan, et Curtis J. Mettlin. 2005. « Age-specific ovarian cancer incidence rate patterns in the United States ». *Gynecologic Oncology* 99 (1): 248-50. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.06.052>.
- Rajkovic, Aleksandar, Stephanie A. Pangas, Daniel Ballow, Nobuhiro Suzumori, et Martin M. Matzuk. 2004. « NOBOX Deficiency Disrupts Early Folliculogenesis and Oocyte-Specific Gene Expression ». *Science* 305 (5687): 1157-59. <https://doi.org/10.1126/science.1099755>.
- Rastetter, Raphael H., Pascal Bernard, James S. Palmer, A-A Chassot, Huijun Chen, Patrick S. Western, Robert G. Ramsay, Marie-Christine Chaboissier, et Dagmar Wilhelm. 2014. « Marker genes identify three somatic cell types in the fetal mouse ovary ». *Developmental Biology* 394 (2): 242-52. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.08.013>.
- Raverdeau, M., A. Gely-Pernot, B. Feret, C. Dennefeld, G. Benoit, I. Davidson, P. Chambon, M. Mark, et N. B. Ghyselinck. 2012. « Retinoic Acid Induces Sertoli Cell Paracrine Signals for Spermatogonia Differentiation but Cell Autonomously Drives Spermatoocyte Meiosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (41): 16582-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214936109>.
- Rebourcet, Diane, Peter J. O'Shaughnessy, Jean-Luc Pitetti, Ana Monteiro, Laura O'Hara, Laura Milne, Yi Ting Tsai, et al. 2014. « Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis ». *Development (Cambridge, England)* 141 (10): 2139-49. <https://doi.org/10.1242/dev.107029>.
- Reik, W. 2001. « Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development ». *Science* 293 (5532): 1089-93. <https://doi.org/10.1126/science.1063443>.
- Resnick, James L., Lynn S. Bixler, Linzhao Cheng, et Peter J. Donovan. 1992. « Long-Term Proliferation of Mouse Primordial Germ Cells in Culture ». *Nature* 359 (6395): 550-51. <https://doi.org/10.1038/359550a0>.
- Reuter, Victor E. 2005. « Origins and Molecular Biology of Testicular Germ Cell Tumors ». *Modern Pathology* 18 (2): S51-60. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800309>.
- Reya, Tannishtha, et Hans Clevers. 2005. « Wnt Signalling in Stem Cells and Cancer ». *Nature* 434 (7035): 843-50. <https://doi.org/10.1038/nature03319>.
- Richardson, Brian E., et Ruth Lehmann. 2010. « Mechanisms Guiding Primordial Germ Cell Migration: Strategies from Different Organisms ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (1): 37. <https://doi.org/10.1038/nrm2815>.
- Richter, M., J. Gottanka, C. A. May, U. Welge-Lüssen, W. Berger, et E. Lütjen-Drecoll. 1998. « Retinal Vasculature Changes in Norrie Disease Mice. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39 (12): 2450-57.
- Riggleman, Bob, Paul Schedl, et Eric Wieschaus. 1990. « Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless ». *Cell* 63 (3): 549-60. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90451-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90451-J).

- Rios-Esteves, Jessica, et Marilyn D. Resh. 2013. « Stearoyl CoA Desaturase Is Required to Produce Active, Lipid-Modified Wnt Proteins ». *Cell Reports* 4 (6): 1072-81. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.027>.
- Ross, A., S. Munger, et B. Capel. 2007. « Bmp7 Regulates Germ Cell Proliferation in Mouse Fetal Gonads ». *Sexual Development* 1 (2): 127-37. <https://doi.org/10.1159/000100034>.
- Rossant, J, R Zirngibl, D Cado, M Shago, et V Giguere. 1991. « Expression of a Retinoic Acid Response Element-HsplacZ Transgene Defines Specific Domains of Transcriptional Activity during Mouse Embryogenesis. » *Genes & Development* 5 (8): 1333-44. <https://doi.org/10.1101/gad.5.8.1333>.
- Roth, Lawrence, et Aleksander Talerman. 2006. « Recent Advances in the Pathology and Classification of Ovarian Germ Cell Tumors ». *International Journal of Gynecological Pathology* 25 (4): 305-20. <https://doi.org/10.1097/01.pgp.0000225844.59621.9d>.
- Rubinfeld, Bonnee, Paul Robbins, Mona El-Gamil, Iris Albert, Emilio Porfiri, et Paul Polakis. 1997. « Stabilization of β -Catenin by Genetic Defects in Melanoma Cell Lines ». *Science* 275 (5307): 1790-92. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1790>.
- Runyan, Christopher, Ying Gu, Amanda Shoemaker, Leendert Looijenga, et Christopher Wylie. 2004. « The Distribution and Behavior of Extragonadal Primordial Germ Cells in Bax Mutant Mice Suggest a Novel Origin for Sacrococcygeal Germ Cell Tumors ». *International Journal of Developmental Biology* 52 (4): 333-44. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072486cr>.
- Runyan, Christopher, Kyle Schaible, Kathleen Molyneaux, Zhuoqiao Wang, Linda Levin, et Christopher Wylie. 2006. « Steel Factor Controls Midline Cell Death of Primordial Germ Cells and Is Essential for Their Normal Proliferation and Migration ». *Development* 133 (24): 4861-69. <https://doi.org/10.1242/dev.02688>.
- Ryland, Georgina L., Sally M. Hunter, Maria A. Doyle, Simone M. Rowley, Michael Christie, Prue E. Allan, David DL Bowtell, Kylie L. Gorringer, et Ian G. Campbell. 2013. « RNF43 Is a Tumour Suppressor Gene Mutated in Mucinous Tumours of the Ovary ». *The Journal of Pathology* 229 (3): 469-76. <https://doi.org/10.1002/path.4134>.
- Saba, Rie, Yuzuru Kato, et Yumiko Saga. 2014. « NANOS2 Promotes Male Germ Cell Development Independent of Meiosis Suppression ». *Developmental Biology* 385 (1): 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.018>.
- Saha, Subhrajit, Evelyn Aranda, Yoku Hayakawa, Payel Bhanja, Safinur Atay, N Patrik Brodin, Jiufeng Li, et al. 2016. « Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury ». *Nature Communications* 7 (octobre). <https://doi.org/10.1038/ncomms13096>.
- Saitou, M., S. Kagiwada, et K. Kurimoto. 2012. « Epigenetic Reprogramming in Mouse Pre-Implantation Development and Primordial Germ Cells ». *Development* 139 (1): 15-31. <https://doi.org/10.1242/dev.050849>.
- Saitou, Mitinori. 2009. « Germ cell specification in mice ». *Current Opinion in Genetics & Development*, Pattern formation and developmental mechanisms, 19 (4): 386-95. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.06.003>.
- Saitou, Mitinori, Sheila C. Barton, et M. Azim Surani. 2002. « A Molecular Programme for the Specification of Germ Cell Fate in Mice ». *Nature* 418 (6895): 293-300. <https://doi.org/10.1038/nature00927>.
- Saitou, Mitinori, et Masashi Yamaji. 2012. « Primordial Germ Cells in Mice ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (11): a008375. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375>.
- Samarut, Eric, et Cécile Rochette-Egly. 2012. « Nuclear retinoic acid receptors: Conductors of the retinoic acid symphony during development ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, Nuclear Receptor Structure: Dynamics and Function, 348 (2): 348-60. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.03.025>.
- Sánchez, Flor, Tom Adriaenssens, Sergio Romero, et Johan Smits. 2010. « Different Follicle-Stimulating Hormone Exposure Regimens During Antral Follicle Growth Alter Gene Expression in the Cumulus-Oocyte Complex in Mice ». *Biology of Reproduction* 83 (4): 514-24. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.083311>.
- Sánchez, Flor, et Johan Smits. 2012. « Molecular Control of Oogenesis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822 (12): 1896-1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>.
- Sanders, Jessica R., et Keith T. Jones. 2018. « Regulation of the Meiotic Divisions of Mammalian Oocytes and Eggs ». *Biochemical Society Transactions* 46 (4): 797-806. <https://doi.org/10.1042/BST20170493>.
- Saneyoshi, Takeo, Shoen Kume, Yoshiharu Amasaki, et Katsuhiko Mikoshiba. 2002. « The Wnt/Calcium Pathway Activates NF-AT and Promotes Ventral Cell Fate in Xenopus Embryos ». *Nature* 417 (6886): 295-99. <https://doi.org/10.1038/417295a>.
- Sanlaville, Damien, François Vialard, François Thépot, Luce Vue-Droy, Azarnouche Ardalan, Patrice Nizard, Alain Corré, et al. 2004. « Functional Disomy of Xp Including Duplication of DAX1 Gene with Sex Reversal Due to t(X;Y)(P21.2;P11.3) ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 128A (3): 325-30. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30115>.

- Sansom, Owen J., Karen R. Reed, Marc van de Wetering, Vanesa Muncan, Douglas J. Winton, Hans Clevers, et Alan R. Clarke. 2005. « Cyclin D1 Is Not an Immediate Target of β -Catenin Following Apc Loss in the Intestine ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (31): 28463-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500191200>.
- Santa Barbara, Pascal de, Catherine Méjean, Brigitte Moniot, Marie-Hélène Malcès, Philippe Berta, et Brigitte Boizet-Bonhoure. 2001. « Steroidogenic Factor-1 Contributes to the Cyclic-Adenosine Monophosphate Down-Regulation of Human SRY Gene Expression1 ». *Biology of Reproduction* 64 (3): 775-83. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.775>.
- Sapkota, Gopal, Claudio Alarcón, Francesca M. Spagnoli, Ali H. Brivanlou, et Joan Massagué. 2007. « Balancing BMP Signaling through Integrated Inputs into the Smad1 Linker ». *Molecular Cell* 25 (3): 441-54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.006>.
- Sasaki, Hiroyuki, et Yasuhisa Matsui. 2008. « Epigenetic Events in Mammalian Germ-Cell Development: Reprogramming and Beyond ». *Nature Reviews Genetics* 9 (2): 129-40. <https://doi.org/10.1038/nrg2295>.
- Sato, Masatake, Tohru Kimura, Ken Kurokawa, Yukiko Fujita, Koichiro Abe, Masaaki Masuhara, Teruo Yasunaga, Akihide Ryo, Mikio Yamamoto, et Toru Nakano. 2002. « Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells ». *Mechanisms of Development* 113 (1): 91-94. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00002-3).
- Sato, Noboru, Laurent Meijer, Leandros Skaltsounis, Paul Greengard, et Ali H. Brivanlou. 2004. « Maintenance of Pluripotency in Human and Mouse Embryonic Stem Cells through Activation of Wnt Signaling by a Pharmacological GSK-3-Specific Inhibitor ». *Nature Medicine* 10 (1): 55-63. <https://doi.org/10.1038/nm979>.
- Sato, Toshiro, Johan H. van Es, Hugo J. Snippert, Daniel E. Stange, Robert G. Vries, Maaïke van den Born, Nick Barker, Noah F. Shroyer, Marc van de Wetering, et Hans Clevers. 2011. « Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts ». *Nature* 469 (7330): 415-18. <https://doi.org/10.1038/nature09637>.
- Sato, Toshiro, Robert G. Vries, Hugo J. Snippert, Marc van de Wetering, Nick Barker, Daniel E. Stange, Johan H. van Es, et al. 2009. « Single Lgr5 Stem Cells Build Crypt-Villus Structures in Vitro without a Mesenchymal Niche ». *Nature* 459 (7244): 262-65. <https://doi.org/10.1038/nature07935>.
- Satoh, Wataru, Makoto Matsuyama, Hiromasa Takemura, Shinichi Aizawa, et Akihiko Shimono. 2008. « Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 Regulate the Wnt/ β -Catenin and the Planar Cell Polarity Pathways during Early Trunk Formation in Mouse ». *Genesis* 46 (2): 92-103. <https://doi.org/10.1002/dvg.20369>.
- Saunders, P. T. K., J. M. A. Turner, M. Ruggiu, M. Taggart, P. S. Burgoyne, D. Elliott, et H. J. Cooke. 2003. « Absence of MDazl Produces a Final Block on Germ Cell Development at Meiosis ». *Reproduction (Cambridge, England)* 126 (5): 589-97.
- Schafer Alan J., Dominguez-Steglich Marina A., Guioli Silvana, Kwok Cheni, Weller Polly A., Stevanovic Milena, Weissenbach Jean, et al. 1995. « The role of SOX9 in autosomal sex reversal and campomelic dysplasia ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 350 (1333): 271-78. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0161>.
- Schepers, Goslik, Megan Wilson, Dagmar Wilhelm, et Peter Koopman. 2003. « SOX8 Is Expressed during Testis Differentiation in Mice and Synergizes with SF1 to Activate the Amh Promoter in Vitro ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (30): 28101-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304067200>.
- Schmahl, Jennifer, et Blanche Capel. 2003. « Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad ». *Developmental Biology* 258 (2): 264-76. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00122-2).
- Schmahl, Jennifer, E. M. Eicher, L. L. Washburn, et B. Capel. 2000. « Sry Induces Cell Proliferation in the Mouse Gonad ». *Development* 127 (1): 65-73.
- Schmahl, Jennifer, Yuna Kim, Jennifer S. Colvin, David M. Ornitz, et Blanche Capel. 2004. « Fgf9 Induces Proliferation and Nuclear Localization of FGFR2 in Sertoli Precursors during Male Sex Determination ». *Development* 131 (15): 3627-36. <https://doi.org/10.1242/dev.01239>.
- Schmidt, Dirk, Catherine E. Ovitt, Katrin Anlag, Sandra Fehsenfeld, Lars Gredsted, Anna-Corina Treier, et Mathias Treier. 2004. « The Murine Winged-Helix Transcription Factor Foxl2 Is Required for Granulosa Cell Differentiation and Ovary Maintenance ». *Development* 131 (4): 933-42. <https://doi.org/10.1242/dev.00969>.
- Schneider, Dominik T., Amy E. Schuster, Michael K. Fritsch, Jie Hu, Thomas Olson, Stephen Lauer, Ulrich Göbel, et Elizabeth J. Perlman. 2001. « Multipoint Imprinting Analysis Indicates a Common Precursor Cell for Gonadal and Nongonadal Pediatric Germ Cell Tumors ». *Cancer Research* 61 (19): 7268-76.
- Schneider, Marlon R., Ruth Schmidt-Ullrich, et Ralf Paus. 2009. « The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan ». *Current Biology* 19 (3): R132-42. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.005>.
- Scholz, Beate, Claudia Korn, Jessica Wojtarowicz, Carolin Mogler, Iris Augustin, Michael Boutros, Christof Niehrs, et Hellmut G. Augustin. 2016. « Endothelial RSPO3 Controls Vascular Stability and Pruning

- through Non-canonical WNT/Ca²⁺/NFAT Signaling ». *Developmental Cell* 36 (1): 79-93. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.015>.
- Schwarz-Romond, Thomas, Marc Fiedler, Naoki Shibata, P. Jonathan G. Butler, Akira Kikuchi, Yoshiki Higuchi, et Mariann Bienz. 2007. « The DIX Domain of Dishevelled Confers Wnt Signaling by Dynamic Polymerization ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (6): 484-92. <https://doi.org/10.1038/nsmb1247>.
- Seeherunvong, Tossaporn, Erasmo M. Perera, Yong Bao, Paul J. Benke, Adelaida Benigno, Roger P. Donahue, et Gary D. Berkovitz. 2004. « 46,XX Sex Reversal with Partial Duplication of Chromosome Arm 22q ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 127A (2): 149-51. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20630>.
- Seki, Yoshiyuki, Katsuhiko Hayashi, Kunihiko Itoh, Michinao Mizugaki, Mitinori Saitou, et Yasuhisa Matsui. 2005. « Extensive and Orderly Reprogramming of Genome-Wide Chromatin Modifications Associated with Specification and Early Development of Germ Cells in Mice ». *Developmental Biology* 278 (2): 440-58. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.025>.
- Seki, Yoshiyuki, Masashi Yamaji, Yukihiro Yabuta, Mitsue Sano, Mayo Shigeta, Yasuhisa Matsui, Yumiko Saga, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, et Mitinori Saitou. 2007. « Cellular Dynamics Associated with the Genome-Wide Epigenetic Reprogramming in Migrating Primordial Germ Cells in Mice ». *Development* 134 (14): 2627-38. <https://doi.org/10.1242/dev.005611>.
- Sekido, Ryohei, et Robin Lovell-Badge. 2008. « Sex Determination Involves Synergistic Action of SRY and SF1 on a Specific *Sox9* Enhancer ». *Nature* 453 (7197): 930-34. <https://doi.org/10.1038/nature06944>.
- Semënov, Mikhail, Keiko Tamai, et Xi He. 2005. « SOST Is a Ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt Signaling Inhibitor ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (29): 26770-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504308200>.
- Semënov, Mikhail V, Keiko Tamai, Barbara K Brott, Michael Kühl, Sergei Sokol, et Xi He. 2001. « Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6 ». *Current Biology* 11 (12): 951-61. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00290-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00290-1).
- Semënov, Mikhail V., Xinjun Zhang, et Xi He. 2008. « DKK1 Antagonizes Wnt Signaling without Promotion of LRP6 Internalization and Degradation ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (31): 21427-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800014200>.
- Seshagiri, Somasekar, Eric W. Stawiski, Steffen Durinck, Zora Modrusan, Elaine E. Storm, Caitlin B. Conboy, Subhra Chaudhuri, et al. 2012. « Recurrent R-spondin fusions in colon cancer ». *Nature* 488 (7413): 660-64. <https://doi.org/10.1038/nature11282>.
- Sharma, R. P., et V. L. Chopra. 1976. « Effect of the wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster* ». *Developmental Biology* 48 (2): 461-65. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90108-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90108-1).
- Shima, Yuichi, Sawako Matsuzaki, Kanako Miyabayashi, Hiroyuki Otake, Takashi Baba, Shigeaki Kato, Ilpo Huhtaniemi, et Ken-ichirou Morohashi. 2015. « Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis ». *Molecular Endocrinology* 29 (11): 1581-93. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1200>.
- Shirakawa, T., R. Yaman-Deveci, S.-i. Tomizawa, Y. Kamizato, K. Nakajima, H. Sone, Y. Sato, et al. 2013. « An Epigenetic Switch Is Crucial for Spermatogonia to Exit the Undifferentiated State toward a Kit-Positive Identity ». *Development* 140 (17): 3565-76. <https://doi.org/10.1242/dev.094045>.
- Siegfried, Esther, Tze-Bin Chou, et Norbert Perrimon. 1992. « wingless signaling acts through *zeste-white 3*, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate ». *Cell* 71 (7): 1167-79. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80065-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80065-0).
- Sinclair, Andrew H., Philippe Berta, Mark S. Palmer, J. Ross Hawkins, Beatrice L. Griffiths, Matthijs J. Smith, Jamie W. Foster, Anna-Maria Frischauf, Robin Lovell-Badge, et Peter N. Goodfellow. 1990. « A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif ». *Nature* 346 (6281): 240. <https://doi.org/10.1038/346240a0>.
- Skakkebaek, N. E., J. G. Berthelsen, A. Giwercman, et J. Müller. 1987. « Carcinoma-in-Situ of the Testis: Possible Origin from Gonocytes and Precursor of All Types of Germ Cell Tumours except Spermatocytoma ». *International Journal of Andrology* 10 (1): 19-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00161.x>.
- Skinner, M. K, Tung, et Fritz. 1985. « Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components ». *The Journal of Cell Biology* 100 (6): 1941-47.
- Smith, Craig A, Christina M Shoemaker, Kelly N Roeszler, Joanna Queen, David Crews, et Andrew H Sinclair. 2008. « Cloning and Expression of R-Spondin1 in Different Vertebrates Suggests a Conserved Role in Ovarian Development ». *BMC Developmental Biology* 8 (1): 72. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-72>.
- Sock, Elisabeth, Katy Schmidt, Irm Hermanns-Borgmeyer, Michael R. Bösl, et Michael Wegner. 2001. « Idiopathic Weight Reduction in Mice Deficient in the High-Mobility-Group Transcription Factor

- Sox8 ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (20): 6951-59. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.6951-6959.2001>.
- Song, Robert X-D., Zhenguo Zhang, et Richard J. Santen. 2005. « Estrogen rapid action via protein complex formation involving ER α and Src ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 16 (8): 347-53. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.06.010>.
- Sonne, Si Brask, Kristian Almstrup, Marlene Dalgaard, Agnieszka Sierakowska Juncker, Daniel Edsgard, Ludmila Ruban, Neil J Harrison, et al. 2009. « Analysis of Gene Expression Profiles of Microdissected Cell Populations Indicates that Testicular Carcinoma In Situ is an Arrested Gonocyte ». *Cancer research* 69 (12): 5241-50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4554>.
- Sousa Lopes, Susana M. Chuva de, Bernard A.J. Roelen, Rui M. Monteiro, Roul Emmens, Herbert Y. Lin, En Li, Kirstie A. Lawson, et Christine L. Mummery. 2004. « BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo ». *Genes & Development* 18 (15): 1838-49. <https://doi.org/10.1101/gad.294004>.
- Soyal, S. M., A. Amlah, et J. Dean. 2000. « FIGalpha, a Germ Cell-Specific Transcription Factor Required for Ovarian Follicle Formation ». *Development* 127 (21): 4645-54.
- Speed, R. M. 1982. « Meiosis in the Foetal Mouse Ovary ». *Chromosoma* 85 (3): 427-37. <https://doi.org/10.1007/BF00330366>.
- Spink, Katharine Eklof, Sofiya G. Fridman, et William I. Weis. 2001. « Molecular mechanisms of β -catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC- β -catenin complex ». *The EMBO Journal* 20 (22): 6203-12. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6203>.
- Spradling, Allan, Daniela Drummond-Barbosa, et Toshie Kai. 2001. « Stem Cells Find Their Niche ». *Nature* 414 (6859): 98-104. <https://doi.org/10.1038/35102160>.
- Städeli, Reto, Raymond Hoffmans, et Konrad Basler. 2006. « Transcription under the Control of Nuclear Arm/ β -Catenin ». *Current Biology* 16 (10): R378-85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.019>.
- Stallock, James, Kathy Molyneaux, Kyle Schaible, C. Michael Knudson, et Christopher Wylie. 2003. « The Pro-Apoptotic Gene Bax Is Required for the Death of Ectopic Primordial Germ Cells during Their Migration in the Mouse Embryo ». *Development* 130 (26): 6589-97. <https://doi.org/10.1242/dev.00898>.
- Stamos, Jennifer L, Matthew Ling-Hon Chu, Michael D Enos, Niket Shah, et William I Weis. 2014. « Structural Basis of GSK-3 Inhibition by N-Terminal Phosphorylation and by the Wnt Receptor LRP6 ». *ELife* 3 (mars): e01998. <https://doi.org/10.7554/eLife.01998>.
- Starz-Gaiano, Michelle, et Ruth Lehmann. 2001. « Moving towards the next generation ». *Mechanisms of Development, Molecular Mechanisms of Cell Migration during Embryogenesis*, 105 (1): 5-18. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00392-6).
- Stévant, Isabelle, Yasmine Neirijnck, Christelle Borel, Jessica Escoffier, Lee B. Smith, Stylianos E. Antonarakis, Emmanouil T. Dermitzakis, et Serge Nef. 2018. « Deciphering Cell Lineage Specification during Male Sex Determination with Single-Cell RNA Sequencing ». *Cell Reports* 22 (6): 1589-99. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.043>.
- Stevens, Leroy C. 1964. « EXPERIMENTAL PRODUCTION OF TESTICULAR TERATOMAS IN MICE* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52 (3): 654-61.
- Su, Wenhui, Dolores D. Mruk, et C. Yan Cheng. 2013. « Regulation of Actin Dynamics and Protein Trafficking during Spermatogenesis – Insights into a Complex Process ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 48 (2): 153-72. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.758084>.
- Suzuki, Hitomi, Masayuki Tsuda, Makoto Kiso, et Yumiko Saga. 2008. « Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways ». *Developmental Biology* 318 (1): 133-42. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.020>.
- Svingen, Terje, et Peter Koopman. 2013. « Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations ». *Genes & Development* 27 (22): 2409-26. <https://doi.org/10.1101/gad.228080.113>.
- Swain, Amanda, Veronica Narvaez, Paul Burgoyne, Giovanna Camerino, et Robin Lovell-Badge. 1998. « Dax1 Antagonizes Sry Action in Mammalian Sex Determination ». *Nature* 391 (6669): 761. <https://doi.org/10.1038/35799>.
- Szybek, Krystyna. 1972. « IN-VITRO MATURATION OF OOCYTES FROM SEXUALLY IMMATURE MICE ». *Journal of Endocrinology* 54 (3): 527-28. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0540527>.
- Tachibana, Makoto, Jun Ueda, Mikiko Fukuda, Naoki Takeda, Tsutomu Ohta, Hiroko Iwanari, Toshiko Sakihama, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, et Yoichi Shinkai. 2005. « Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9 ». *Genes & Development* 19 (7): 815-26. <https://doi.org/10.1101/gad.1284005>.
- Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, et al. 2009. « Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1 ». *Science* 324 (5929): 930-35. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>.

- Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126 (4): 663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Takao, Yukinari, Takashi Yokota, et Hiroshi Koide. 2007. « β -Catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353 (3): 699-705. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.072>.
- Taketo, Teruko, Jamilah Saeed, Tom Manganaro, Masahiko Takahashi, et Patricia K. Donahoe. 1993. « Müllerian Inhibiting Substance Production Associated with Loss of Oocytes and Testicular Differentiation in the Transplanted Mouse XX Gonadal Primordium ». *Biology of Reproduction* 49 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.1.13>.
- Tam, P. P. L., et M. H. L. Snow. 1981. « Proliferation and Migration of Primordial Germ Cells during Compensatory Growth in Mouse Embryos ». *Development* 64 (1): 133-47.
- Tam, Wai-Leong, Chin Yan Lim, Jianyong Han, Jinqiu Zhang, Yen-Sin Ang, Huck-Hui Ng, Henry Yang, et Bing Lim. 2008. « T-Cell Factor 3 Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Self-Renewal by the Transcriptional Control of Multiple Lineage Pathways ». *Stem Cells* 26 (8): 2019-31. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1115>.
- Tamai, Keiko, Mikhail Semenov, Yoichi Kato, Rebecca Spokony, Chunming Liu, Yu Katsuyama, Fred Hess, Jean-Pierre Saint-Jeannet, et Xi He. 2000. « LDL-Receptor-Related Proteins in Wnt Signal Transduction ». *Nature* 407 (6803): 530-35. <https://doi.org/10.1038/35035117>.
- Tamai, Keiko, Xin Zeng, Chunming Liu, Xinjun Zhang, Yuko Harada, Zhijie Chang, et Xi He. 2004. « A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation ». *Molecular Cell* 13 (1): 149-56. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00484-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00484-2).
- Tanaka, H., L. a. V. D. Pereira, M. Nozaki, J. Tsuchida, K. Sawada, H. Mori, et Y. Nishimune. 1998. « A Germ Cell-Specific Nuclear Antigen Recognized by a Monoclonal Antibody Raised against Mouse Testicular Germ Cells ». *International Journal of Andrology* 20 (6): 361-66. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1998.00080.x>.
- Tanaka, Satomi S, et Yasuhisa Matsui. 2002. « Developmentally regulated expression of mil-1 and mil-2, mouse interferon-induced transmembrane protein like genes, during formation and differentiation of primordial germ cells ». *Mechanisms of Development* 119 (décembre): S261-67. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00126-6).
- Tanaka, Satomi S., Yayoi Toyooka, Ryuko Akasu, Yuko Katoh-Fukui, Yoko Nakahara, Rika Suzuki, Minesuke Yokoyama, et Toshiaki Noce. 2000. « The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells ». *Genes & Development* 14 (7): 841-53.
- Tang, Elizabeth I., Will M. Lee, et C. Yan Cheng. 2016. « Coordination of Actin- and Microtubule-Based Cytoskeletons Supports Transport of Spermatids and Residual Bodies/Phagosomes During Spermatogenesis in the Rat Testis ». *Endocrinology* 157 (4): 1644-59. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1962>.
- Tarín, Juan J, Miguel A García-Pérez, Toshio Hamatani, et Antonio Cano. 2015. « Infertility etiologies are genetically and clinically linked with other diseases in single meta-diseases ». *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 13 (avril). <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0029-9>.
- Tauriello, Daniele V. F., Ingrid Jordens, Katharina Kirchner, Jerry W. Slootstra, Tom Kruitwagen, Britta A. M. Bouwman, Maria Noutsou, et al. 2012. « Wnt/ β -catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (14): E812-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114802109>.
- Taylor, J, N Abramova, J Charlton, et P N Adler. 1998. « Van Gogh: a new Drosophila tissue polarity gene. » *Genetics* 150 (1): 199-210.
- Teletin, Marius, Nadège Vernet, Norbert B. Ghyselinck, et Manuel Mark. 2017. « Chapter Seven - Roles of Retinoic Acid in Germ Cell Differentiation ». In *Current Topics in Developmental Biology*, édité par Douglas Forrest et Sophia Tsai, 125:191-225. Nuclear Receptors in Development and Disease. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.013>.
- Terzi, Menderes Yusuf, Muzeyyen Izmirli, et Bulent Gogebakan. 2016. « The Cell Fate: Senescence or Quiescence ». *Molecular Biology Reports* 43 (11): 1213-20. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4065-0>.
- Tienen, Laurens M van, Juliusz Mieszczanek, Marc Fiedler, Trevor J Rutherford, et Mariann Bienz. 2017. « Constitutive scaffolding of multiple Wnt enhanceosome components by Legless/BCL9 ». *eLife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.20882>.
- Tilmann, C., et B. Capel. 1999. « Mesonephric Cell Migration Induces Testis Cord Formation and Sertoli Cell Differentiation in the Mammalian Gonad ». *Development* 126 (13): 2883-90.

- Tomaselli, Sara, Francesca Megiorni, Carmelilia De Bernardo, Aldo Felici, Giacinto Marrocco, Giorgio Maggiulli, Barbara Grammatico, et al. 2008. « Syndromic True Hermaphroditism Due to an R-Spondin1 (RSPO1) Homozygous Mutation ». *Human Mutation* 29 (2): 220-26. <https://doi.org/10.1002/humu.20665>.
- Tomizuka, Kazuma, Kaori Horikoshi, Rina Kitada, Yuriko Sugawara, Yumi Iba, Ayako Kojima, Akiko Yoshitome, et al. 2008. « R-Spondin1 Plays an Essential Role in Ovarian Development through Positively Regulating Wnt-4 Signaling ». *Human Molecular Genetics* 17 (9): 1278-91. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn036>.
- Townsley, Fiona M., Adam Cliffe, et Mariann Bienz. 2004. « Pygopus and Legless Target Armadillo/ β -Catenin to the Nucleus to Enable Its Transcriptional Co-Activator Function ». *Nature Cell Biology* 6 (7): 626-33. <https://doi.org/10.1038/ncb1141>.
- Trautmann, Emilie, Marie-Justine Guerquin, Clotilde Duquenne, Jean-Baptiste Lahaye, René Habert, et Gabriel Livera. 2008. « Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes ». *Cell Cycle* 7 (5): 656-64. <https://doi.org/10.4161/cc.7.5.5482>.
- Tremblay, Kimberly D., N. Ray Dunn, et Elizabeth J. Robertson. 2001. « Mouse Embryos Lacking Smad1 Signals Display Defects in Extra-Embryonic Tissues and Germ Cell Formation ». *Development* 128 (18): 3609-21.
- Trepatt, Xavier, Zaozao Chen, et Ken Jacobson. 2012. « Cell Migration ». *Comprehensive Physiology* 2 (4): 2369. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110012>.
- Tsuda, Masayuki, Yumiko Sasaoka, Makoto Kiso, Kuniya Abe, Seiki Haraguchi, Satoru Kobayashi, et Yumiko Saga. 2003. « Conserved Role of Nanos Proteins in Germ Cell Development ». *Science* 301 (5637): 1239-41. <https://doi.org/10.1126/science.1085222>.
- Uda, Manuela, Chris Ottolenghi, Laura Crisponi, Jose Elias Garcia, Manila Deiana, Wendy Kimber, Antonino Forabosco, Antonio Cao, David Schlessinger, et Giuseppe Pilia. 2004. « Foxl2 Disruption Causes Mouse Ovarian Failure by Pervasive Blockage of Follicle Development ». *Human Molecular Genetics* 13 (11): 1171-81. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh124>.
- Uhlenhaut, N. Henriette, Susanne Jakob, Katrin Anlag, Tobias Eisenberger, Ryohei Sekido, Jana Kress, Anna-Corina Treier, et al. 2009. « Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation ». *Cell* 139 (6): 1130-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.021>.
- Ungewitte, E.K., et H.H.-C. Yao. 2013. « How to Make a Gonad: Cellular Mechanisms Governing Formation of the Testes and Ovaries ». *Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 7 (1-3): 7-20. <https://doi.org/10.1159/000338612>.
- Üren, Aykut, Frieda Reichsman, Vasiliki Anest, William G. Taylor, Kanae Muraiso, Donald P. Bottaro, Susan Cumberledge, et Jeffrey S. Rubin. 2000. « Secreted Frizzled-Related Protein-1 Binds Directly to Wingless and Is a Biphasic Modulator of Wnt Signaling ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (6): 4374-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4374>.
- Vainio, Seppo, Minna Heikkilä, Andreas Kispert, Norman Chin, et Andrew P. McMahon. 1999. « Female Development in Mammals Is Regulated by Wnt-4 Signalling ». *Nature* 397 (6718): 405. <https://doi.org/10.1038/17068>.
- Van Beneden, Edouard. 1883. « Recherches sur la maturation de l'oeuf, la fécondation, et la division cellulaire ». <https://orbi.uliege.be/handle/2268/203818>.
- Van Raay, Terence J., Kathryn B. Moore, Ilina Iordanova, Michael Steele, Milan Jamrich, William A. Harris, et Monica L. Vetter. 2005. « Frizzled 5 Signaling Governs the Neural Potential of Progenitors in the Developing Xenopus Retina ». *Neuron* 46 (1): 23-36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.023>.
- van Amerongen, Renée, Angela N. Bowman, et Roel Nusse. 2012. « Developmental Stage and Time Dictate the Fate of Wnt/ β -Catenin-Responsive Stem Cells in the Mammary Gland ». *Cell Stem Cell* 11 (3): 387-400. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.023>.
- Vanderfyden, Barbara C., Evelyn E. Telfer, et John J. Eppig. 1992. « Mouse Oocytes Promote Proliferation of Granulosa Cells from Preantral and Antral Follicles in Vitro ». *Biology of Reproduction* 46 (6): 1196-1204. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.6.1196>.
- Vergouwen, R. P. F. A., S. G. P. M. Jacobs, R. Huiskamp, J. a. G. Davids, et D. G. de Rooij. 1991. « Proliferative Activity of Gonocytes, Sertoli Cells and Interstitial Cells during Testicular Development in Mice ». *Reproduction* 93 (1): 233-43. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0930233>.
- Vernet, Nadège, Manuel Mark, Diana Condrea, Betty Féret, Muriel Klopfenstein, Violaine Alunni, Marius Teletin, et Norbert B. Ghyselinck. 2019. « Meiosis Initiates In The Fetal Ovary Of Mice Lacking All Retinoic Acid Receptor Isoforms ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/716498>.
- Vidal, Valerie P. I., Marie-Christine Chaboissier, Dirk G. de Rooij, et Andreas Schedl. 2001. « Sox9 Induces Testis Development in XX Transgenic Mice ». *Nature Genetics* 28 (3): 216. <https://doi.org/10.1038/90046>.

- Vilella, Albert J., Jessica Severin, Abel Ureta-Vidal, Li Heng, Richard Durbin, et Ewan Birney. 2009. « EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates ». *Genome Research* 19 (2): 327-35. <https://doi.org/10.1101/gr.073585.107>.
- Visser, Karin E. de, Metamia Ciampricotti, Ewa M. Michalak, David Wei-Min Tan, Ewoud N. Speksnijder, Cheei-Sing Hau, Hans Clevers, Nick Barker, et Jos Jonkers. 2012. « Developmental Stage-Specific Contribution of LGR5+ Cells to Basal and Luminal Epithelial Lineages in the Postnatal Mammary Gland ». *The Journal of Pathology* 228 (3): 300-309. <https://doi.org/10.1002/path.4096>.
- Vitt, Ursula A., Elizabeth A. McGee, Masaru Hayashi, et Aaron J. W. Hsueh. 2000. « In Vivo Treatment with GDF-9 Stimulates Primordial and Primary Follicle Progression and Theca Cell Marker CYP17 in Ovaries of Immature Rats ». *Endocrinology* 141 (10): 3814-20. <https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7732>.
- Vlad, Annica, Sonja Röhrs, Ludger Klein-Hitpass, et Oliver Müller. 2008. « The first five years of the Wnt targetome ». *Cellular Signalling* 20 (5): 795-802. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.031>.
- Wagner, Ryan T., Xueping Xu, Fei Yi, Bradley J. Merrill, et Austin J. Cooney. 2010. « Canonical Wnt/ β -Catenin Regulation of Liver Receptor Homolog-1 Mediates Pluripotency Gene Expression ». *STEM CELLS* 28 (10): 1794-1804. <https://doi.org/10.1002/stem.502>.
- Wallacides, Angelina, Amand Chesnel, Dominique Chardard, Stéphane Flament, et Hélène Dumond. 2009. « Evidence for a Conserved Role of Retinoic Acid in Urodele Amphibian Meiosis Onset ». *Developmental Dynamics* 238 (6): 1389-98. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21948>.
- Walter, Marius, Aurélie Teissandier, Raquel Pérez-Palacios, et Déborah Bourc'his. 2016. « An Epigenetic Switch Ensures Transposon Repression upon Dynamic Loss of DNA Methylation in Embryonic Stem Cells ». *ELife* 5 (janvier): e11418. <https://doi.org/10.7554/eLife.11418>.
- Wang, Bruce, Ludan Zhao, Matt Fish, Catriona Y. Logan, et Roel Nusse. 2015. « Self-renewing diploid Axin2+ cells fuel homeostatic renewal of the liver ». *Nature* 524 (7564): 180-85. <https://doi.org/10.1038/nature14863>.
- Wang, Fay, John Flanagan, Nan Su, Li-Chong Wang, Son Bui, Allissa Nielson, Xingyong Wu, Hong-Thuy Vo, Xiao-Jun Ma, et Yuling Luo. 2012. « RNAscope ». *The Journal of Molecular Diagnostics* 14 (1): 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>.
- Wang, Ke, Yazhou Zhang, Xiaofeng Li, Lijun Chen, He Wang, Jianguo Wu, Jie Zheng, et Dianqing Wu. 2008. « Characterization of the Kremen-binding Site on Dkk1 and Elucidation of the Role of Kremen in Dkk-mediated Wnt Antagonism ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (34): 23371-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802376200>.
- Wang, Man-Tzu, Matthew Holderfield, Jacqueline Galeas, Reyno Delrosario, Minh D. To, Allan Balmain, et Frank McCormick. 2015. « K-Ras Promotes Tumorigenicity through Suppression of Non-Canonical Wnt Signaling ». *Cell* 163 (5): 1237-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.041>.
- Wang, Wei, Kristin B. Runkle, Samantha M. Terkowski, Rachel I. Ekaireb, et Eric S. Witze. 2015. « Protein Depalmitoylation Is Induced by Wnt5a and Promotes Polarized Cell Behavior ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (25): 15707-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639609>.
- Wang, Yanshu, Nini Guo, et Jeremy Nathans. 2006. « The Role of Frizzled3 and Frizzled6 in Neural Tube Closure and in the Planar Polarity of Inner-Ear Sensory Hair Cells ». *Journal of Neuroscience* 26 (8): 2147-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4698-05.2005>.
- Weber, Susanne, Dawid Eckert, Daniel Nettersheim, Ad J. M. Gillis, Sabine Schäfer, Peter Kuckenberger, Julia Ehlermann, et al. 2010. « Critical Function of AP-2gamma/TCFAP2C in Mouse Embryonic Germ Cell Maintenance ». *Biology of Reproduction* 82 (1): 214-23. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078717>.
- Weeraratna, Ashani T., Yuan Jiang, Galen Hostetter, Kevin Rosenblatt, Paul Duray, Michael Bittner, et Jeffrey M. Trent. 2002. « Wnt5a Signaling Directly Affects Cell Motility and Invasion of Metastatic Melanoma ». *Cancer Cell* 1 (3): 279-88. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00045-4).
- Wehrli, Marcel, Scott T. Dougan, Kim Caldwell, Louise O'Keefe, Stephanie Schwartz, Dalit Vaizel-Ohayon, Eyal Schejter, Andrew Tomlinson, et Stephen DiNardo. 2000. « Arrow Encodes an LDL-Receptor-Related Protein Essential for Wingless Signalling ». *Nature* 407 (6803): 527-30. <https://doi.org/10.1038/35035110>.
- Welsh, Michelle, Philippa T. K. Saunders, Nina Atanassova, Richard M. Sharpe, et Lee B. Smith. 2009. « Androgen Action via Testicular Peritubular Myoid Cells Is Essential for Male Fertility ». *The FASEB Journal* 23 (12): 4218-30. <https://doi.org/10.1096/fj.09-138347>.
- West, Jason A., Srinivas R. Viswanathan, Akiko Yabuuchi, Kerianne Cunniff, Ayumu Takeuchi, In-Hyun Park, Julia E. Sero, et al. 2009. « A role for Lin28 in primordial germ cell development and germ cell malignancy ». *Nature* 460 (7257): 909-13. <https://doi.org/10.1038/nature08210>.
- Western, Patrick S., Denise C. Miles, Jocelyn A. van den Bergen, Matt Burton, et Andrew H. Sinclair. 2008. « Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells ». *STEM CELLS* 26 (2): 339-47. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622>.

- Westfall, Trudi A., Ryan Brimeyer, Jen Twedt, Jean Gladon, Andrea Olberding, Makoto Furutani-Seiki, et Diane C. Slusarski. 2003. « Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/ β -catenin activity ». *The Journal of Cell Biology* 162 (5): 889-98. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303107>.
- Wetering, Marc van de, Robert Cavallo, Dennis Dooijes, Moniek van Beest, Johan van Es, Joseph Loureiro, Arne Ypma, et al. 1997. « Armadillo Coactivates Transcription Driven by the Product of the Drosophila Segment Polarity Gene dTCF ». *Cell* 88 (6): 789-99. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81925-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81925-X).
- Wijgerde, Mark, Marja Ooms, Jos W. Hoogerbrugge, et J. Anton Grootegoed. 2005. « Hedgehog Signaling in Mouse Ovary: Indian Hedgehog and Desert Hedgehog from Granulosa Cells Induce Target Gene Expression in Developing Theca Cells ». *Endocrinology* 146 (8): 3558-66. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0311>.
- Wilhelm, Dagmar, et Christoph Englert. 2002. « The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl ». *Genes & Development* 16 (14): 1839-51. <https://doi.org/10.1101/gad.220102>.
- Wilhelm, Dagmar, Fred Martinson, Stephen Bradford, Megan J. Wilson, Alexander N. Combes, Annemiek Beverdam, Josephine Bowles, Hirofumi Mizusaki, et Peter Koopman. 2005. « Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination ». *Developmental Biology* 287 (1): 111-24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.039>.
- Willert, Karl, Jeffrey D. Brown, Esther Danenberg, Andrew W. Duncan, Irving L. Weissman, Tannishttha Reya, John R. Yates, et Roel Nusse. 2003. « Wnt Proteins Are Lipid-Modified and Can Act as Stem Cell Growth Factors ». *Nature* 423 (6938): 448-52. <https://doi.org/10.1038/nature01611>.
- Wray, Jason, Tüzer Kalkan, Sandra Gomez-Lopez, Dominik Eckardt, Andrew Cook, Rolf Kemler, et Austin Smith. 2011. « Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation ». *Nature cell biology* 13 (7): 838-45. <https://doi.org/10.1038/ncb2267>.
- Wu, Geng, Guozhou Xu, Brenda A. Schulman, Philip D. Jeffrey, J. Wade Harper, et Nikola P. Pavletich. 2003. « Structure of a β -TrCP1-Skp1- β -Catenin Complex: Destruction Motif Binding and Lysine Specificity of the SCF β -TrCP1 Ubiquitin Ligase ». *Molecular Cell* 11 (6): 1445-56. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00234-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00234-X).
- Wu, Jian, Yuchen Jiao, Marco Dal Molin, Anirban Maitra, Roeland F. de Wilde, Laura D. Wood, James R. Eshleman, et al. 2011. « Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (52): 21188-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118046108>.
- Wu, Joy Y., Thomas J. Ribar, David E. Cummings, Kimberly A. Burton, G. Stanley McKnight, et Anthony R. Means. 2000. « Spermiogenesis and Exchange of Basic Nuclear Proteins Are Impaired in Male Germ Cells Lacking Camk4 ». *Nature Genetics* 25 (4): 448-52. <https://doi.org/10.1038/78153>.
- Wu, Susan C., et Yi Zhang. 2010. « Active DNA Demethylation: Many Roads Lead to Rome ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (9): 607-20. <https://doi.org/10.1038/nrm2950>.
- Xing, Yi, Ken-Ichi Takemaru, Jing Liu, Jason D. Berndt, Jie J. Zheng, Randall T. Moon, et Wenqing Xu. 2008. « Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin ». *Structure* 16 (3): 478-87. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.12.021>.
- Xu, Qiang, Yanshu Wang, Alain Dabdoub, Philip M Smallwood, John Williams, Chad Woods, Matthew W Kelley, et al. 2004. « Vascular Development in the Retina and Inner Ear: Control by Norrin and Frizzled-4, a High-Affinity Ligand-Receptor Pair ». *Cell* 116 (6): 883-95. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00216-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00216-8).
- Yabuta, Yukihiro, Kazuki Kurimoto, Yasuhide Ohinata, Yoshiyuki Seki, et Mitinori Saitou. 2006. « Gene Expression Dynamics During Germline Specification in Mice Identified by Quantitative Single-Cell Gene Expression Profiling ». *Biology of Reproduction* 75 (5): 705-16. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053686>.
- Yamaguchi, Shinpei, Kazuki Kurimoto, Yukihiro Yabuta, Hiroyuki Sasaki, Norio Nakatsuji, Mitinori Saitou, et Takashi Tada. 2009. « Conditional Knockdown of Nanog Induces Apoptotic Cell Death in Mouse Migrating Primordial Germ Cells ». *Development* 136 (23): 4011-20. <https://doi.org/10.1242/dev.041160>.
- Yamaji, Masashi, Yoshiyuki Seki, Kazuki Kurimoto, Yukihiro Yabuta, Mihoko Yuasa, Mayo Shigeta, Kaori Yamanaka, Yasuhide Ohinata, et Mitinori Saitou. 2008. « Critical Function of *Prdm14* for the Establishment of the Germ Cell Lineage in Mice ». *Nature Genetics* 40 (8): 1016-22. <https://doi.org/10.1038/ng.186>.
- Yamamoto, Akihito, Takashi Nagano, Shoko Takehara, Masahiko Hibi, et Shinichi Aizawa. 2005. « Shisa Promotes Head Formation through the Inhibition of Receptor Protein Maturation for the Caudalizing Factors, Wnt and FGF ». *Cell* 120 (2): 223-35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.051>.

- Yan, Kelley S., Claudia Y. Janda, Junlei Chang, Grace X.Y. Zheng, Kathryn A. Larkin, Vincent C. Luca, Luis A. Chia, et al. 2017. « Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem cell self-renewal ». *Nature* 545 (7653): 238-42. <https://doi.org/10.1038/nature22313>.
- Yao, H. H.-C. 2003. « Meiotic Germ Cells Antagonize Mesonephric Cell Migration and Testis Cord Formation in Mouse Gonads ». *Development* 130 (24): 5895-5902. <https://doi.org/10.1242/dev.00836>.
- Yao, Humphrey H.C., Martin M. Matzuk, Carolina J. Jorgez, Douglas B. Menke, David C. Page, Amanda Swain, et Blanche Capel. 2004. « Follistatin Operates Downstream of Wnt4 in Mammalian Ovary Organogenesis ». *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 230 (2): 210-15. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20042>.
- Yao, Humphrey Hung-Chang, Wendy Whoriskey, et Blanche Capel. 2002. « Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis ». *Genes & Development* 16 (11): 1433-40. <https://doi.org/10.1101/gad.981202>.
- Yi, Fei, Laura Pereira, Jackson A. Hoffman, Brian R. Shy, Courtney M. Yuen, David R. Liu, et Bradley J. Merrill. 2011. « Opposing Effects of Tcf3 and Tcf1 Control Wnt-Stimulation of Embryonic Stem Cell Self Renewal ». *Nature cell biology* 13 (7): 762-70. <https://doi.org/10.1038/ncb2283>.
- Yi, Fei, Laura Pereira, et Bradley J. Merrill. 2008. « Tcf3 Functions as a Steady State Limiter of Transcriptional Programs of Mouse Embryonic Stem Cell Self Renewal ». *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (8): 1951-60. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0229>.
- Ying, Ying, Xiao-Ming Liu, Amy Marble, Kirstie A. Lawson, et Guang-Quan Zhao. 2000. « Requirement of Bmp8b for the Generation of Primordial Germ Cells in the Mouse ». *Molecular Endocrinology* 14 (7): 1053-63. <https://doi.org/10.1210/mend.14.7.0479>.
- Ying, Ying, et Guang-Quan Zhao. 2001. « Cooperation of Endoderm-Derived BMP2 and Extraembryonic Ectoderm-Derived BMP4 in Primordial Germ Cell Generation in the Mouse ». *Developmental Biology* 232 (2): 484-92. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0173>.
- Yokobayashi, Shihori, Ching-Yeu Liang, Hubertus Kohler, Peter Nestorov, Zichuan Liu, Miguel Vidal, Maarten van Lohuizen, Tim C. Roloff, et Antoine H. F. M. Peters. 2013. « PRC1 Coordinates Timing of Sexual Differentiation of Female Primordial Germ Cells ». *Nature* 495 (7440): 236-40. <https://doi.org/10.1038/nature11918>.
- Yoon, C., K. Kawakami, et N. Hopkins. 1997. « Zebrafish Vasa Homologue RNA Is Localized to the Cleavage Planes of 2- and 4-Cell-Stage Embryos and Is Expressed in the Primordial Germ Cells ». *Development* 124 (16): 3157-65.
- Yoshida, S. 2006. « The First Round of Mouse Spermatogenesis Is a Distinctive Program That Lacks the Self-Renewing Spermatogonia Stage ». *Development* 133 (8): 1495-1505. <https://doi.org/10.1242/dev.02316>.
- Yoshikawa, Shingo, Randall D. McKinnon, Michelle Kokel, et John B. Thomas. 2003. « Wnt-Mediated Axon Guidance via the Drosophila Derailed Receptor ». *Nature* 422 (6932): 583-88. <https://doi.org/10.1038/nature01522>.
- Young, J. M., et A. S. McNeilly. 2010. « Theca: The Forgotten Cell of the Ovarian Follicle ». *Reproduction* 140 (4): 489-504. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0094>.
- Young, Richard A. 2011. « Control of Embryonic Stem Cell State ». *Cell* 144 (6): 940-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.032>.
- Youngren, Kirsten K., Douglas Coveney, Xiaoning Peng, Chitralekha Bhattacharya, Laura S. Schmidt, Michael L. Nickerson, Bruce T. Lamb, et al. 2005. « The Ter mutation in the Dead-end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours ». *Nature* 435 (7040): 360-64. <https://doi.org/10.1038/nature03595>.
- Yu, Richard N., Masafumi Ito, Thomas L. Saunders, Sally A. Camper, et J. Larry Jameson. 1998. « Role of Ahch in Gonadal Development and Gametogenesis ». *Nature Genetics* 20 (4): 353. <https://doi.org/10.1038/3822>.
- Zamboni, L., et S. Upadhyay. 1983. « Germ Cell Differentiation in Mouse Adrenal Glands ». *The Journal of Experimental Zoology* 228 (2): 173-93. <https://doi.org/10.1002/jez.1402280204>.
- Zechel, J. L., G. T. MacLennan, J. D. Heaney, et J. H. Nadeau. 2011. « Spontaneous metastasis in mouse models of testicular germ-cell tumours ». *International journal of andrology* 34 (4 0 2): e278-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01160.x>.
- Zechner, Dietmar, Yasuyuki Fujita, Jörg Hülsken, Thomas Müller, Ingrid Walther, Makoto M Taketo, E Bryan Crenshaw, Walter Birchmeier, et Carmen Birchmeier. 2003. « β -Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system ». *Developmental Biology* 258 (2): 406-18. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00123-4).
- Zeng, Yi Arial, et Roel Nusse. 2010. « Wnt Proteins Are Self-Renewal Factors for Mammary Stem Cells and Promote Their Long-Term Expansion in Culture ». *Cell Stem Cell* 6 (6): 568-77. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.020>.
- Zhang, Suping, Liguang Chen, Bing Cui, Han-Yu Chuang, Jianqiang Yu, Jessica Wang-Rodriguez, Li Tang, George Chen, Grzegorz W. Basak, et Thomas J. Kipps. 2012. « ROR1 Is Expressed in Human Breast

- Cancer and Associated with Enhanced Tumor-Cell Growth ». *PloS One* 7 (3): e31127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031127>.
- Zheng, Wenjing, Hua Zhang, Nagaraju Gorre, Sanjiv Risal, Yan Shen, et Kui Liu. 2014. « Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions ». *Human Molecular Genetics* 23 (4): 920-28. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt486>.
- Zhou, Yehui, Jing Lan, Wei Wang, Qin Shi, Yang Lan, Zhiyi Cheng, et Honggeng Guan. 2013. « ZNRF3 Acts as a Tumour Suppressor by the Wnt Signalling Pathway in Human Gastric Adenocarcinoma ». *Journal of Molecular Histology* 44 (5): 555-63. <https://doi.org/10.1007/s10735-013-9504-9>.
- Zhu, A. J., et F. M. Watt. 1999. « Beta-Catenin Signalling Modulates Proliferative Potential of Human Epidermal Keratinocytes Independently of Intercellular Adhesion ». *Development* 126 (10): 2285-98.
- Zhu, Rui, Michelina Iacovino, Elisabeth Mahen, Michael Kyba, et Angabin Matin. 2011. « Transcripts that associate with the RNA binding protein, DEAD-END (DND1), in embryonic stem (ES) cells ». *BMC Molecular Biology* 12 (août): 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-37>.
- Zile, Maija H. 2001. « Function of Vitamin A in Vertebrate Embryonic Development ». *The Journal of Nutrition* 131 (3): 705-8. <https://doi.org/10.1093/jn/131.3.705>.