



**HAL**  
open science

# Caractérisation des cellules souches germinales : étude phénotypique chez l'Homme et rôle de la méthyltransférase DOT1L

Clémentine Lapoujade

► **To cite this version:**

Clémentine Lapoujade. Caractérisation des cellules souches germinales : étude phénotypique chez l'Homme et rôle de la méthyltransférase DOT1L. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL102 . tel-03982473

**HAL Id: tel-03982473**

**<https://theses.hal.science/tel-03982473v1>**

Submitted on 10 Feb 2023

**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.

Caractérisation des cellules souches  
germinales : étude phénotypique chez  
l'Homme et rôle de la méthyltransférase  
DOT1L

*Characterization of spermatogonial stem cells: phenotypic study in human  
and role of the methyltransferase DOT1L*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°577 : Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)  
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé  
Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **SGCSR (Université Paris-Saclay, Inserm, CEA)**, sous la direction de **Pierre FOUCHET**, directeur de recherche CEA

**Thèse soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 22 décembre 2022, par**

**Clémentine LAPOUJADE**

**Composition du Jury**

Membres du jury avec voix délibérative

<b>Filippo ROSSELLI</b> Directeur de recherche, Université Paris-Saclay, CNRS, IGR	Président
<b>Bertrand PAIN</b> Directeur de recherche, Université Lyon 1, INRA	Rapporteur et examinateur
<b>Christine WYNS</b> Professeure, Université catholique de Louvain	Rapporteur et examinatrice
<b>Aminata TOURE</b> Directrice de recherche, Université Grenoble Alpes, CNRS, IAB	Examinatrice



**Titre :** Caractérisation des cellules souches germinales : étude phénotypique chez l'Homme et rôle de la méthyltransférase DOT1L

**Mots clés :** Cellules souches – spermatogenèse – autorenouvellement – humain

**Résumé :** La spermatogenèse assure dès la puberté la production de spermatozoïdes à partir d'un nombre restreint de cellules souches germinales (CSGs). La régulation aberrante des mécanismes d'autorenouvellement/différenciation des CSGs peut entraîner soit la perte du pool de cellules souches et une infertilité, soit une prolifération cellulaire incontrôlée pouvant être à l'origine de tumeurs germinales. Le développement de nouvelles technologies en reproduction humaine est nécessaire afin d'apporter des solutions curatives aux troubles de la fertilité consécutifs aux traitements anticancéreux, responsable de l'atteinte du stock de CSGs. Bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires de régulation des CSGs chez les organismes modèles et la souris, comprendre l'interaction complexe des réseaux de régulation au cours du développement de la lignée germinale reste un défi majeur chez l'Homme. L'identité du pool de CSGs humaines et les mécanismes moléculaires gouvernant leur autorenouvellement restent peu connus malgré les récents progrès réalisés grâce aux approches par scRNAseq. Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation des cellule souches germinales.

Une première partie de mon travail de thèse a consisté à développer un nouveau panel de 14 marqueurs cellulaires permettant par cytométrie spectrale de mieux décrire et résoudre la complexité de la population de spermatogonies primitives humaines, contenant les cellules souches et les progéniteurs spermatogoniaux immatures. Dans une seconde partie, j'ai étudié le rôle de l'histone méthyltransférase DOT1L dans la régulation du destin des CSGs dans un modèle murin d'inactivation conditionnelle de *Dot1l* dans le lignage germinale. Nous observons notamment chez ces souris déficientes pour *Dot1l* une diminution du pool de cellules souches germinales, un déficit fonctionnel de ces cellules, et un défaut de différenciation dans la population de spermatogonie indifférenciées, évoquant un vieillissement prématuré de ces progéniteurs immatures. Dans les souris âgées de plus d'un an, on observe une accumulation anormale des spermatogonies indifférenciées, soulignant un problème de différenciation des progéniteurs immatures. Ces données soulignent le rôle des modulateurs épigénétiques en tant qu'acteur majeur dans les prises de décision des cellules souches quant à leur destin cellulaire.

**Title :** Characterization of spermatogonial stem cells: phenotypic study in human and role of the methyltransferase DOT1L

**Keywords :** Stem cells- selfrenewal – spermatogenesis - human

**Abstract :** From puberty onwards, spermatogenesis ensures the production of spermatozoa from a limited number of spermatogonial stem cells (SSCs). Aberrant regulation of the self-renewal/differentiation mechanisms of SSCs can lead either to the loss of the stem cell pool and infertility, or to uncontrolled cell proliferation that can lead to germ cell tumours. The development of new technologies in human reproduction is necessary to provide curative solutions to the fertility problems caused by cancer treatments, which are responsible for the attrition of the SSCs pool. Although significant progress has been made in understanding the molecular mechanisms of SSCs regulation in model organisms and mice, understanding the complex interaction of regulatory networks during germline development remains a major challenge in humans. The identity of the human SSCs pool and the molecular mechanisms governing their self-renewal remain poorly understood despite the recent progress made by scRNAseq approaches. My thesis work focused on the characterization of germline stem cells.

The first part of my thesis work consisted in developing a new panel of 14 cellular markers allowing by spectral cytometry to better describe and resolve the complexity of the human primitive spermatogonial population, containing stem cells and immature spermatogonial progenitors. In a second part, I studied the role of the histone methyltransferase DOT1L in the regulation of SSCs fate in a mouse model of *Dot1l* conditional invalidation in the germline. In particular, we observe in these *Dot1l*-deficient mice a decrease in the pool of germline stem cells, a functional deficit of these cells, and a differentiation defect in the pool of undifferentiated spermatogonia, suggesting a premature ageing of the immature progenitor pool. In mice older than one year, there is an abnormal accumulation of undifferentiated spermatogonia, pointing to a differentiation problem. These data highlight the role of epigenetic modulators as a major player in stem cell decisions governing their cell fate.





# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté de participer à ma soutenance. Merci au Pr Christine Wyns et au Dr Bertrand Pain d'être rapporteur de ce travail de thèse. Merci également au Dr Aminata Touré et au Dr Filippo Rosselli de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Merci au Dr François Boussin pour son accueil au sein de son unité de recherche.

Merci à mon directeur de thèse Pierre. Merci de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire. La légende dit, que tu avais plein de candidats pour ta proposition de stage de M2 et moi plein de possibilités de laboratoires différents, mais nous savons tous les deux ce qu'il en était vraiment, et au final aucuns regrets ! Merci de m'avoir accompagnée durant ces 4 années de thèse. J'ai beaucoup appris grâce à tes conseils, ton encadrement (micro-management) et toutes les connaissances que tu m'as transmises. Ta passion pour la recherche et ton esprit toujours actif et plein d'hypothèses sont un exemple à suivre. Merci pour ton soutien et ta patience à toute épreuve. Tu m'as permis de trouver la confiance (dont je manquais beaucoup) et l'énergie pour finir ce travail de thèse. Merci pour tous ces lundis soir passés à chanter au sous-sol devant le trieur. On a formé une bonne équipe scientifique, et un super duo de casseroles.

Merci à Isa, j'ai beaucoup apprécié tous ces moments à discuter de l'actualité, de séries et de nos familles. Mais aussi beaucoup de discussions scientifiques très enrichissantes. Merci pour ton soutien et tes coups de boost lors de ces derniers mois !

Merci à Lydia, pour ta gentillesse et ta patience notamment lorsque tu m'as appris à tenir une souris sans me faire mordre.

Merci à Anne-Sophie, pour ces trois années que nous avons passées ensemble. Des heures de cultures dans la mine, à se raconter nos vies et à chanter ! Tu as été une amie et une

confidente pendant cette thèse. Ton soutien m'a été très précieux. La mine a été beaucoup moins festive après ton départ !

Merci à Maëlle de m'avoir passé le flambeau quand je suis arrivée en stage de M2. Merci d'avoir pris le temps de me former alors que tu étais en pleine écriture de ta thèse. Je sais maintenant à quel point ça a dû être compliqué.

Merci aussi à Gabriella, Denis et Mélina, les nouveaux arrivants avec qui j'ai partagé ces dernières semaines au labo.

Merci à Vilma, Caro et Charlotte. Les pauses dans votre bureau, et les déjeuners partagés ces derniers mois ont été une bouffée d'air frais dans le tumulte de l'écriture. Votre bonne humeur et vos sourires sont contagieux. Merci pour toutes ces discussions et ces moments de détente passés en votre compagnie. Mais surtout merci à toutes les trois pour votre soutien !

Merci à Eléa, nos pauses café du matin, où on se raconte nos vies et on partage tous les potins du labo m'ont permis de commencer chaque journée avec le sourire !

Merci aux « vieux », Luis et Jérôme, de m'avoir accepté à votre table du midi, même si en contrepartie j'ai supporté votre humour plus que douteux, des débats sans fin sur la nourriture et la politique, et vos anecdotes de vie. Luis merci pour ta gentillesse et pour tous ces bons gâteaux basques. Jérôme merci pour tous les films téléchargés, j'espère que tu garderas ta passion pour les téléfilms de Noël. Et merci à Muriel qui nous a souvent rejoint lors de ces midis.

Merci à Arielle et Aurélie qui nous aide dans tous nos problèmes administratifs.

Merci aussi à tous les étudiants du bâtiment. Pauline merci pour nos longues conversations à vouloir changer le quotidien des étudiants en thèse. Merci d'être toujours moteur pour réunir les étudiants ensemble. Vivement la collo' à Londres ! Cathy, merci pour tous ses fous-rire partagés (la mission photo au premier étage) et les petits biscuits aux sésames. Merci à toutes

les deux pour votre soutien ces derniers mois ! Merci aussi à Merick et Corentin, on a partagé les joies de l'écriture ensemble, et on a survécu... Merick, on se revoit en Ecosse.

Un grand merci à toutes les personnes qui se reconnaîtront, pour leur sourire, leur soutien, et pour tous les moments partagés.

Merci à Elise et Camille, de leur soutien.

Enfin, merci à ma famille. C'est en vous que j'ai puisé la confiance et l'énergie pour arriver au bout de ce travail. Merci à Morgan pour tes précieuses relectures et tes commentaires qui m'ont bien fait rire. Merci papa et maman, de m'avoir toujours soutenue dans ses longues études, vous m'avez tous les deux transmis le goût et la curiosité d'apprendre. Merci de votre accompagnement sans faille, d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même. Et pour finir, merci à mes deux personnes préférées. Chloé, Lucile, vous me motivez tous les jours à donner le meilleur de moi-même. Merci pour vos conseils, merci pour votre écoute et merci d'être toujours là pour moi, sans vous rien de tout cela n'aurait été possible.



## Liste des abréviations

Aal : Aaligned	HE : coloration à l'hématoxyline et à l'éosine
ADN : Acide désoxyribonucléique	HKMT : Histone lysine méthyltransférase
ADNdb : ADN double brin	HMT : Histone méthyltransférase
ADNsb : AND simple brin	HR : recombinaison homologue
AF10 : ALL1-fused gene from chromosome 10 protein	ID4 : Inhibitor Of DNA Binding 4, HLH Protein
AF9 : MLLT3 Super Elongation Complex Subunit	In : Intermediate
Apr : Apaired	iPS : cellule souche pluripotente induite
ARN : acide ribonucléique	IR : rayon ionisant
As : Asingle	KO : knock-out
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	LIF : Leukemia Inhibitory Factor
ATR : Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related	MACS : magnetic-activated cell sorting
BER : Base excision repair	MEF : fibroblaste embryonnaire de souris
CpG : cytosine – phosphate – guanine	MiARN : microARN
CRE : Causes Recombination	MLL : Mixed lineage leukemia
CSG : Cellule souche germinale	MMR : Mismatch Repair
DOT1L : Disruptor of telomeric silencing-1-like	MPT : Modification post traductionnelle
Dpp : jours après la naissance (days post partum)	NER : Nucleotide excision repair
DSB : cassures double brin (double strand break)	NHEJ : Non homologous end joining
E : jour embryonnaire	p21 : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
Cellule ES : Cellule souche embryonnaire	p53 : Tumor protein 53
FACS : Fluorescence-activated cell sorting	PcG : Polycomb complexe
FGF: fibroblast growth factor	PGC : Primordial Germ Cell
GDNF : Glial cell line-derived neurotrophic factor	PRC : Polycomb Repressive Complex
GFP : Green Fluorescent Protein	PRDM14 : PR Domain Zinc Finger Protein 14
GFR $\alpha$ 1 : GDNF family receptor alpha-1	PTM : Cellule Myoïde Périvitulaire
GRP125	RA : Acide rétinoïque
GST : Transition gonocyte-spermatogonie	RAR- $\gamma$ : Retinoic acid receptor gamma
H2AX : H2A Histone Family, Member X	RNS : Espèces Réactives de l'Azote
HaGSC : human adult germinal stem cell	ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
HAT : Histone acétyltransférase	ScRNAseq : single cell RNA sequencing
HDAC : histone déacétylases	SEC
HDM : Histone déméthylase	SRY : Sex-dertemining region of y
	SSB : Simple Strand Break
	SSC : Spermatogonial Stem Cell
	TFAP2C : Transcription Factor AP-2 Gamma



# Sommaire

<b>Remerciements</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>11</b>
<b>Sommaire</b>	<b>13</b>
<b>Introduction</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre 1 : De la cellule souche au spermatozoïde</b>	<b>19</b>
I) La spermatogenèse	19
A) Architecture testiculaire	19
B) La lignée germinale	23
1) Émergence de la lignée germinale	23
2) Transition gonocyte-spermatogonie, puberté et différenciation	24
II) Les cellules souches germinales	27
A) Propriétés générales des cellules souches	27
1) Autorenewement et différenciation : division symétrique et asymétrique	27
2) La niche des cellules souches	29
B) Fonctions et caractéristiques des cellules souches germinales	32
1) L'unipotence des CSGs ?	32
2) Méthodologies d'analyse et d'identification des CSGs	34
C) Les marqueurs des CSGs murines et humaines	37
1) Les marqueurs membranaires	37
2) Les marqueurs cytoplasmiques et nucléaires	39
D) Autorenewement et différenciation des CSGs chez la souris	40
1) Mise en place du pool de CSGs chez la souris prépubère	40
2) Les trois différents modèles de régulation des CSGs adultes	43
E) Modèle d'autorenewement et de différenciation de spermatogonies humaines	49
<b>Chapitre 2 : DOT1L, la méthyltransférase de l'histone 3 lysine 79, et son rôle en tant que modulateur épigénétique</b>	<b>53</b>
I) Histones et code épigénétique des histones	55
A) Structure des histones	55
B) Le « code épigénétique » des histones	57
1) L'acétylation des histones	58
2) La méthylation des histones	60
II) Épigénétique et cellule souche : régulation de l'homéostasie et différenciation	61

A)	Paysage épigénétique _____	61
B)	Régulation des marques épigénétiques des histones dans les cellules souches _____	62
1)	Les complexes polycomb et trithorax _____	62
2)	Modifications des histones et notion de gènes bivalents dans les cellules souches _____	64
C)	Les différents types de modifications d'histones observés dans les cellules souches germinales	66
III)	DOT1L et apposition de la marque H3K79 : cross talk avec les autres histones _____	67
A)	La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 79 et DOT1L _____	67
B)	Rôle de DOT1L dans le développement _____	70
C)	Rôle de DOT1L dans les leucémies _____	71
IV)	DOT1L et la réponse aux dommages à l'ADN _____	72
A)	La réponse aux dommages à l'ADN _____	72
B)	Dynamique chromatinienne dans la réponse aux dommages à l'ADN, rôle de DOT1L _____	77
<b>Objectifs</b> _____		<b>81</b>
<b>Résultats</b> _____		<b>87</b>
I)	Caractérisation des cellules souches germinales humaines : étude par cytométrie spectrale d'un nouveau panel de 14 marqueurs cellulaires _____	89
II)	Etude du rôle de la méthyltransférase DOT1L dans l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches germinales _____	123
<b>Discussion</b> _____		<b>165</b>
1)	Préciser l'identité des cellules souches germinales humaines ? _____	168
2)	DOT1L : un nouvel acteur épigénétique de la maintenance et de la différenciation des CSGs	177
<b>Conclusion</b> _____		<b>189</b>
<b>Références</b> _____		<b>195</b>





# Introduction



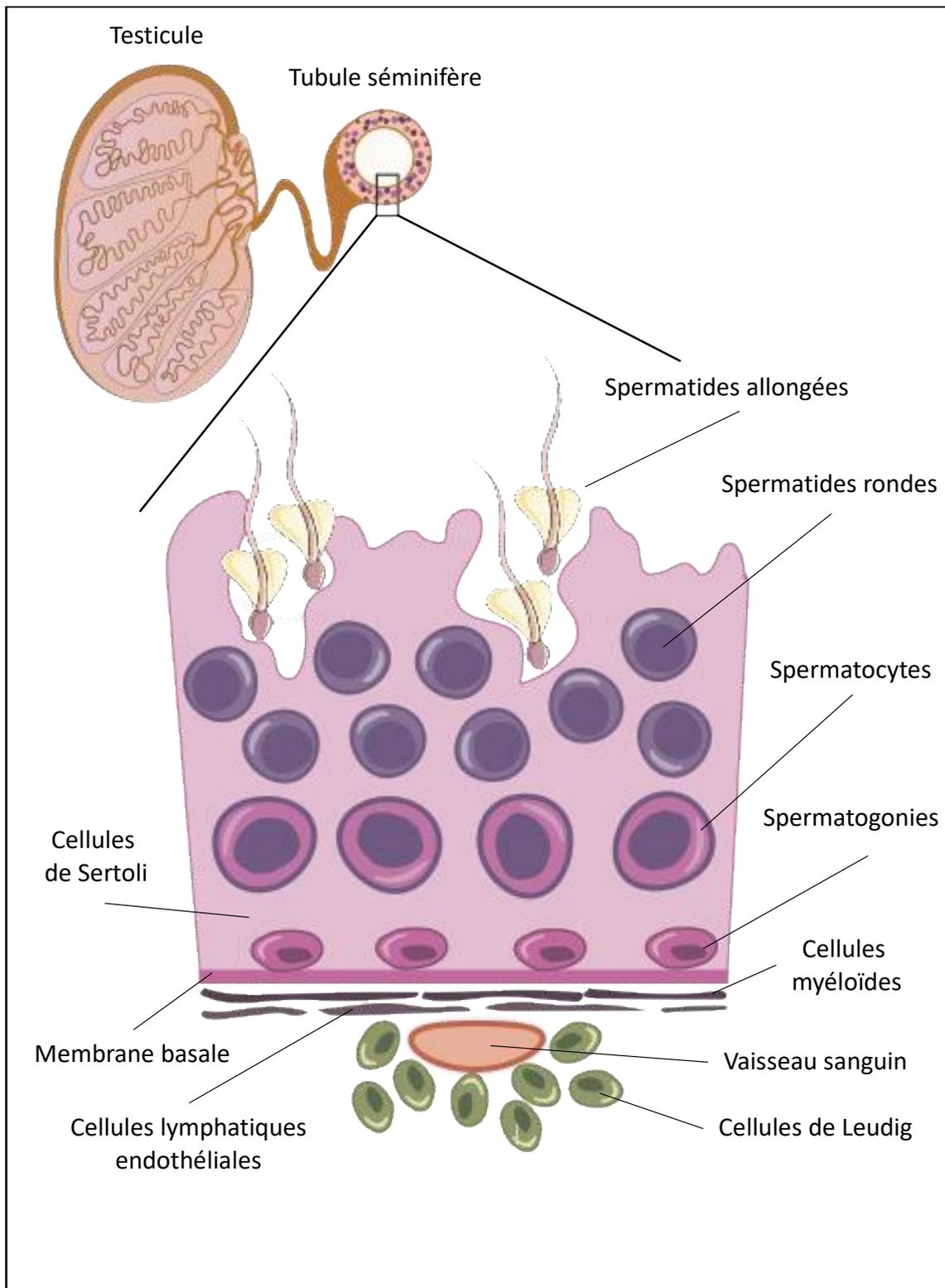
## Chapitre 1 : De la cellule souche au spermatozoïde

### I) La spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus hautement spécialisé de différenciation cellulaire, au cours duquel sont formés des spermatozoïdes fonctionnels, permettant la reproduction. Ce processus se déroule dans les testicules adultes, où l'on retrouve toutes les étapes d'autorenouvellement, d'amplification et de différenciation des progéniteurs du lignage germinal. Au début de ce processus, les cellules souches germinales (CSGs) maintiennent leur nombre par autorenouvellement tout en produisant des cellules progénitrices engagées dans la différenciation. Ces progéniteurs augmentent leur nombre par une série de divisions mitotiques. Enfin, des spermatozoïdes matures sont produits, après la méiose et la spermiogenèse, au cours desquelles interviennent notamment la recombinaison chromosomique, la réduction et la préparation du statut épigénétique du génome afin d'assurer la fécondation et le développement de la génération suivante.

#### A) Architecture testiculaire

Les testicules des mammifères sont constitués de deux compartiments : le compartiment interstitiel et le compartiment des tubules séminifères (Fawcett, Neaves and Flores, 1973; Leeson and Cookson, 1974). Le compartiment interstitiel entoure les tubules séminifères (Figure 1). Il est composé de cellules endothéliales et stromales. Les cellules de Leydig y sont prédominantes, elles y sécrètent des hormones dont la testostérone, le principal androgène (Neaves, 1975; Mori and Christensen, 1980). On retrouve également des macrophages parmi les cellules du compartiment interstitiel, notamment à la surface des tubules séminifères (Hume *et al.*, 1984; DeFalco *et al.*, 2015). Ce compartiment interstitiel ne contribue pas seulement à la fonction endocrine du testicule, mais serait aussi essentiel à la régulation des CSGs à l'intérieur des tubules séminifères. Enfin, dans le compartiment des tubules séminifères, on retrouve une structure simple et uniforme sur toute leur longueur, ils sont séparés en une dizaine de boucles dont les extrémités s'ouvrent sur le *rete testis*. Les tubules séminifères mesurent environ deux mètres de long pour un seul testicule de souris (Russell *et al.*, 1990; Nakata *et al.*, 2015).

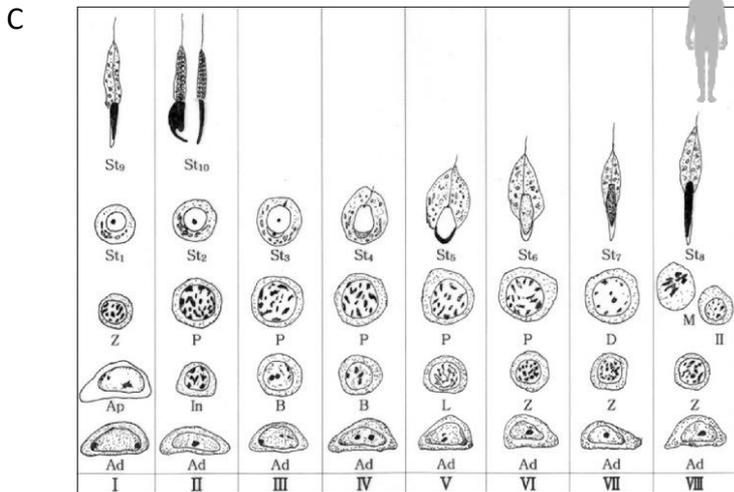
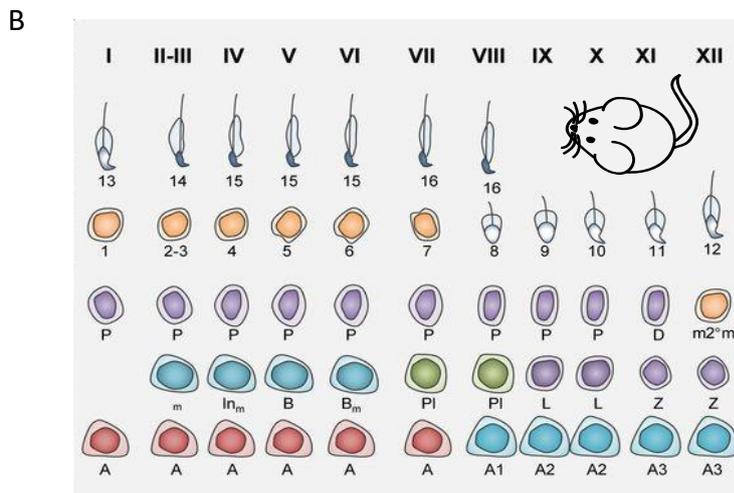
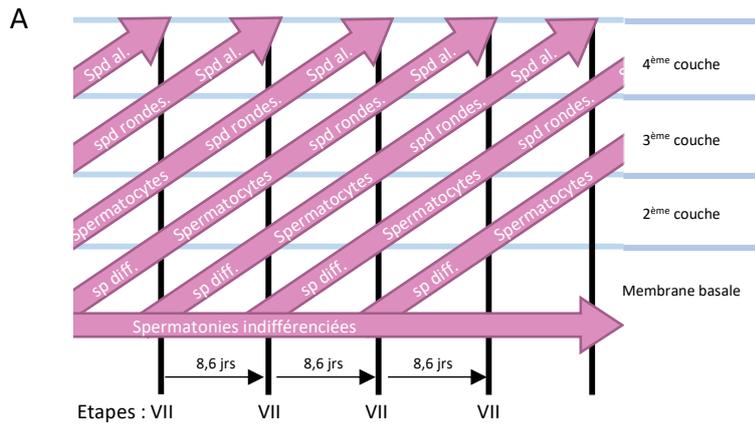


**Figure 1 : Architecture du testicule humain et d'un tubule séminifère**

Les spermatogonies sont situées à la membrane basale de l'épithélium séminifère. Une organisation stratifiée des cellules germinales en cours de différenciation est observable de la membrane basale à la lumière du tubule, ainsi que les cellules somatiques qui les entourent dans l'espace interstitiel.

Le tubule séminifère est enveloppé par des cellules myoïdes périlitubulaires (PTM). Il contient des cellules somatiques, les cellules de Sertoli, qui sécrètent notamment le GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*), un facteur de croissance nécessaire pour la prolifération et la différenciation des CSGs (Parekh, Garcia and Hofmann, 2019). Le réseau prééminent de jonctions serrées entre les cellules de Sertoli crée une barrière qui sépare les tubules en compartiments basaux et adluminaux. Enfin, on retrouve dans ce compartiment, les cellules germinales, responsables de la spermatogenèse. Ainsi, tous les stades des spermatogonies sont situés dans le compartiment basal, tandis que les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes sont situés dans le compartiment adluminal d'une manière orchestrée, illustrant une polarité claire de la périphérie vers le centre (Figure 1).

La spermatogenèse est un processus complexe hautement régulé qui se produit de manière cyclique au sein de l'épithélium séminifère organisé. La transition des spermatogonies indifférenciées vers les spermatogonies différenciées se déroule périodiquement, avec un intervalle régulier de 8,6 jours chez la souris, défini comme le « cycle épithélial séminifère », tandis que leurs descendants sont générés et déplacés à un rythme constant vers la lumière des tubules séminifères (Leblond and Clermont, 1952; Russell *et al.*, 1990). Comme la différenciation complète prend plus d'un mois, des combinaisons des quatre stades différents de différenciation (spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes) sont toujours observées dans une section transversale d'un tube séminifère. L'ordre chronologique des différentes phases du cycle définit 12 (I à XII) stades, les stades II et III décrits à l'origine étant ensuite combinés en un seul stade II-III, ce qui laisse 11 stades. La progression de la spermatogenèse et la configuration répétitive des stades épithéliaux le long du tubule séminifère est appelé onde ou vague spermatogénétique (Figure 2A et B). Ces cycles et ondulations assurent la production continue de spermatozoïdes dans une proportion constante du testicule. L'ensemble du processus de différenciation, des spermatogonies indifférenciées à la libération de spermatozoïdes matures dure 35 jours chez la souris. Chez l'Homme, le cycle épithélial est composé de 6 stades (I-VI) le long de l'épithélium séminifère et prend 16 jours pour être achevé (Figure 2C). Il faut 64 jours à une spermatogonie indifférenciée pour donner un spermatozoïde mature (Johnson, Chaturvedi and Williams, 1992).



**Figure 2 : Cycle de l'épithélium séminifère**

(A) Représentation schématique de la différenciation au sein des différentes couches du tubule séminifère. Un cycle dure 8,6 jours, temps durant lequel une spermatogonie A se différencie en une spermatogonie B (Adapté de Yoshida 2019).

(B) Etape I à XII du cycle chez la souris (Adapté de Griswold 2015).

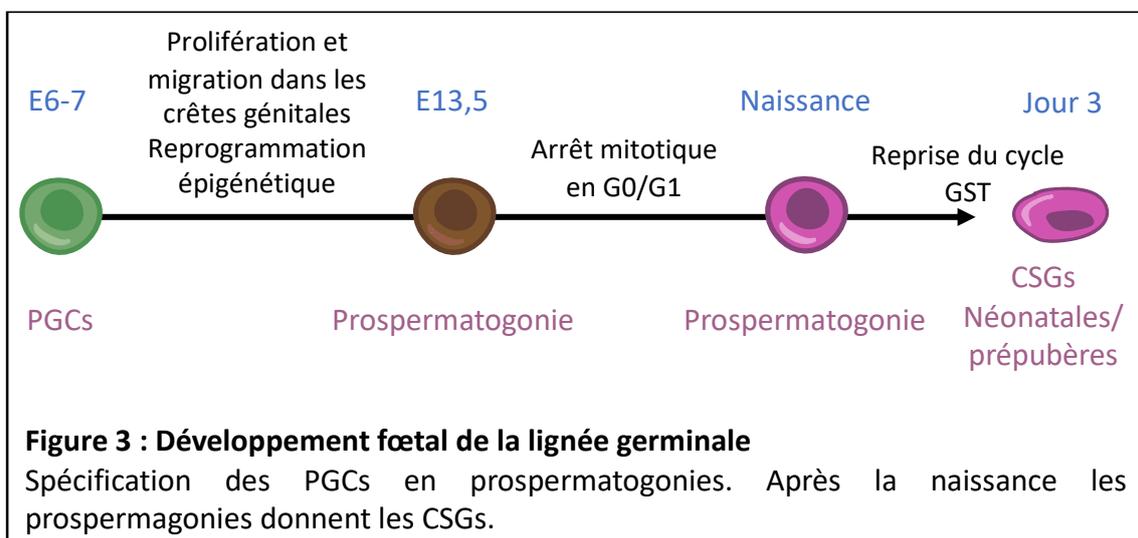
(C) Etape I à VIII du cycle chez l'homme.

## B) La lignée germinale

### 1) Émergence de la lignée germinale

La spécification des précurseurs de la lignée germinale, les cellules germinales primordiales (PGCs), au cours du développement embryonnaire précoce, est essentielle à la continuité de l'espèce car ces cellules donneront finalement naissance à des gamètes matures, des spermatozoïdes et des ovules, chargés de transmettre l'information génétique aux descendants. Les PGCs se forment au cours de l'embryogenèse, généralement selon l'un des deux modes suivants : la préformation et l'épigénèse. La préformation fait référence à l'héritage de déterminant maternel. Elle est basée sur la synthèse, le transport, puis la distribution inégale et l'accumulation d'ARN et de protéines spécifiques dans une certaine zone du cytoplasme de l'ovocyte, appelée plasme germinatif qui permet la spécification de la lignée germinale lors de l'embryogenèse. Le mode de préformation se retrouve chez de nombreuses espèces, dont *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans* et *Xenopus laevis*. Dans le mode d'épigénèse, aucun plasme germinatif déposé par la mère n'est observé, et la lignée germinale est spécifiée à partir d'une population plutôt homogène de cellules embryonnaires grâce à des signaux inducteurs provenant de sources embryonnaires et extra-embryonnaires (Extavour and Akam, 2003; Whittle and Extavour, 2017). Chez la souris, l'Homme et de nombreux autres mammifères, la lignée germinale est déterminée par le mode d'épigénèse. Chez la souris, les PGCs sont spécifiées avant la gastrulation au cours du développement embryonnaire précoce vers le jour embryonnaire (E) 6 à 7, où elles représentent un groupe d'environ 40 cellules. Les PGCs migrent à E10,5 vers les crêtes génitales qu'elles colonisent jusqu'à E13,5 (Saitou and Yamaji, 2012) (Figure 3). Lors de cette phase de prolifération, les PGCs subissent une reprogrammation épigénétique, plus particulièrement, une déméthylation de l'ADN à l'échelle du génome qui inclut l'effacement de l'empreinte génomique (Saitou, Kagiwada and Kurimoto, 2012). Dès E13,5 les PGCs rentrent en arrêt mitotique et restent quiescents dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire pour le reste de la période embryonnaire (Western *et al.*, 2008). Chez la souris, on retrouve trois facteurs de transcription essentiels à l'adoption de l'identité des cellules germinales : BLIMP1 (*B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1*), PRDM14 (*PR Domain Zinc Finger Protein 14*), TFAP2C (*Transcription Factor AP-2 Gamma*) (Ohinata *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2010; Nakaki

and Saitou, 2014). Les PGCs expriment *Blimp1* à E6,5, permettant ainsi la répression du programme somatique et l'activation du programme germinale. L'expression de PRDM14 et de BLIMP1, ainsi que l'induction et le maintien de TFAP2C par ces deux facteurs, sont nécessaires pour assurer la spécification et l'engagement des PGCs. Lorsque *Sry* (sex-determining region of y) est induit, les PGCs gonadiques sont incorporés dans les cordons testiculaires à partir de E12, les cellules germinales présentes dans les cordons testiculaires sont alors appelées gonocytes ou prospermatogonies. Le terme préspermatogenèse est parfois utilisé pour désigner la phase du développement testiculaire impliquant les gonocytes (Hilscher *et al.*, 1974; McCarrey, 2013). Ces cellules ne reprennent l'avancée de leur cycle, qu'après la naissance.



## 2) [Transition gonocyte-spermatogonie, puberté et différenciation](#)

La transition gonocyte-spermatogonie (GST) a lieu environ un jour après la naissance chez la souris (Figure 3). Cette transition implique des changements morphologiques, le gonocyte est une grande cellule sphérique avec un noyau proéminent et il est situé au centre du cordon testiculaire, alors que les spermatogonies sont des cellules de forme ovoïde à la périphérie des tubules séminifères. Les cellules germinales périnatales commencent alors à exprimer des marqueurs qui sont associés aux CSGs chez la souris adulte : les récepteurs GFR $\alpha$ 1 (*GDNF Family Receptor Alpha 1*), et RET (*Receptor Tyrosine Kinase*) et le facteur de transcription PLZF (*Zinc Finger And BTB Domain Containing 16*, officiellement ZBTB16). Le gène anti-méiotique

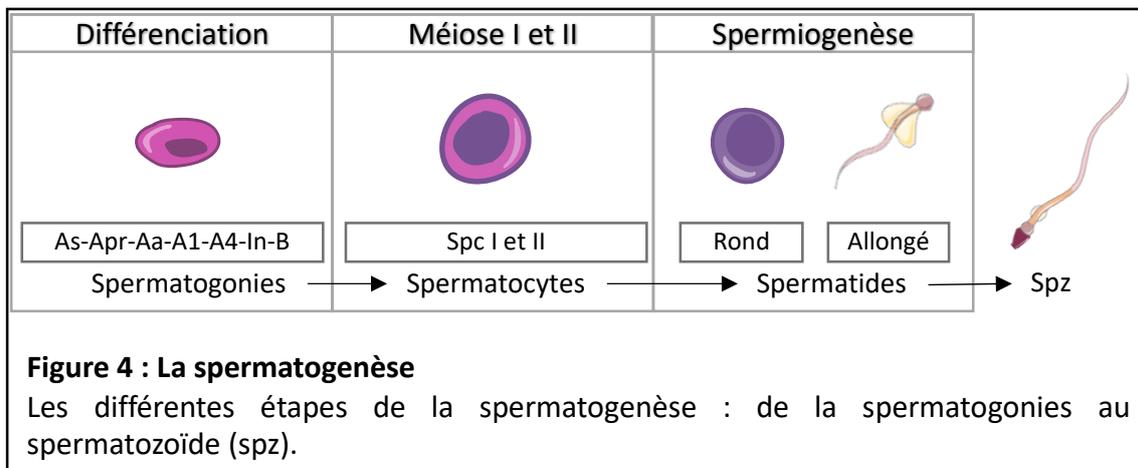
Nanos2 (*Nanos C2HC-Type Zinc Finger 2*), qui est déjà exprimé par les gonocytes précoces de la souris (E12.5), est également régulé à la hausse au même stade (Pui and Saga, 2017). Trois jours après la naissance, les gonocytes ou prospermatogonies soit se différencient en spermatogonies, soit meurent par apoptose. D'après le modèle prépondérant, on retrouve alors deux types de spermatogonies, une population qui assure la première vague de spermatogenèse et une deuxième population qui sera fondatrice des CSGs adultes. Cette phase du développement de la lignée germinale est davantage précisée dans le paragraphe : « Mise en place du pool de CSGs chez la souris prépubère » page 38. La spermatogenèse peut alors débuter, donnant des spermatozoïdes dès la première vague, puis de manière continue pendant la vie adulte. Elle se divise en trois étapes : la phase mitotique, la phase méiotique et la spermiogenèse (Figure 4).

- Phase mitotique

On retrouve lors de cette phase les spermatogonies indifférenciées appelées spermatogonies A. Chez la souris elles sont constituées de cellules uniques, les spermatogonies  $A_s$  et de chaînes de cellules interconnectées qui se forment à la suite d'une cytokinèse incomplète. Ces syncytia peuvent exister sous forme de chaînes de 2, 4, 8 ou 16 cellules et sont appelés spermatogonies  $A_{paired}$  ( $A_{pr}$ ) ou  $A_{aligned}$  ( $A_{al}$ ). Ces chaînes se développent de manière clonale par division mitotique. Les spermatogonies indifférenciées murines subissent périodiquement une différenciation spermatogoniale (transition  $A_{al}$  vers  $A_1$ ) pour devenir des spermatogonies en voie de différenciation :  $A_1/A_2/A_3/A_4$ , In (*Intermediate*) et spermatogonies B (Figure 4). Cette série de six divisions mitotiques permet une amplification des spermatogonies, qui deviennent des spermatocytes et subissent une initiation méiotique (Lok and de Rooij, 1983; Shinohara *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2009). Cependant on peut noter que cette phase d'amplification n'existe pas chez l'Homme (Valli *et al.*, 2014). De plus, au cours de la différenciation des spermatogonies, leur capacité d'autorenouvellement est perdue et leur cycle cellulaire est accéléré. Les deux transitions pré-méiotiques (la différenciation spermatogoniale et l'initiation méiotique) nécessitent l'acide rétinoïque (RA), un dérivé de la vitamine A (van Pelt and de Rooij, 1990; Endo *et al.*, 2017).

- Phase méiotique

Lorsque les spermatogonies de type B perdent le contact avec la membrane basale et se divisent finalement en spermatocytes pré-leptotènes, ces cellules germinales sont prêtes à entrer en méiose, un processus crucial de la spermatogenèse au cours duquel les cellules germinales diploïdes se divisent et se différencient en spermatides haploïdes. Ce processus est réalisé par un cycle de duplication de l'ADN suivi de deux cycles consécutifs de ségrégation des chromosomes : la méiose I (déplacement des chromosomes homologues, chacun constitué d'une paire de chromatides sœurs, vers des pôles opposés) et la méiose II (séparation des chromatides sœurs pour former des cellules haploïdes) ('Molecular control of rodent spermatogenesis', 2012; Sharma, 2013). La prophase méiotique I est divisée en quatre étapes cytologiques : leptotène, zygotène, pachytène et diplotène. La prophase de la deuxième division méiotique est très courte. Au cours de cette phase, les deux chromatides de chaque chromosome se séparent et se déplacent vers les pôles opposés, réduisant le contenu en ADN de moitié. À la fin de la télophase, les spermatides sont haploïdes. Elles vont alors subir une morphogénèse complète : la spermiogénèse.



- La spermiogénèse

La différenciation des spermatides rondes en spermatozoïdes dure environ 2 semaines chez la souris. Les spermatides rondes subissent alors des modifications morphologiques et cytologiques très importantes. Plusieurs processus se produisent simultanément : la formation de l'acrosome, la mise en place des flagelles, le remodelage complet de la chromatine, et l'élimination du cytoplasme. Ces changements aboutissent à la production de spermatozoïdes, qui sont libérés dans la lumière du tubule séminifère pendant la spermiation.

## II) Les cellules souches germinales

Les cellules souches ont pour rôle de maintenir l'homéostasie au sein d'un tissu. Le potentiel souche de ces cellules leur permet de s'autorenouveler à long terme pour maintenir la réserve de cellules souches, et de se différencier en progéniteurs. Les CSGs sont unipotentes et ne peuvent se spécialiser qu'en un seul type cellulaire : les spermatozoïdes. Comme nous l'avons vu auparavant les CSGs se retrouvent au niveau de la membrane basale des tubes séminifères dans les testicules. Elles sont les cellules les plus indifférenciées au sein de la lignée germinale chez l'adulte et sont cruciales pour le maintien de la spermatogenèse tout au long de la vie adulte chez le mâle.

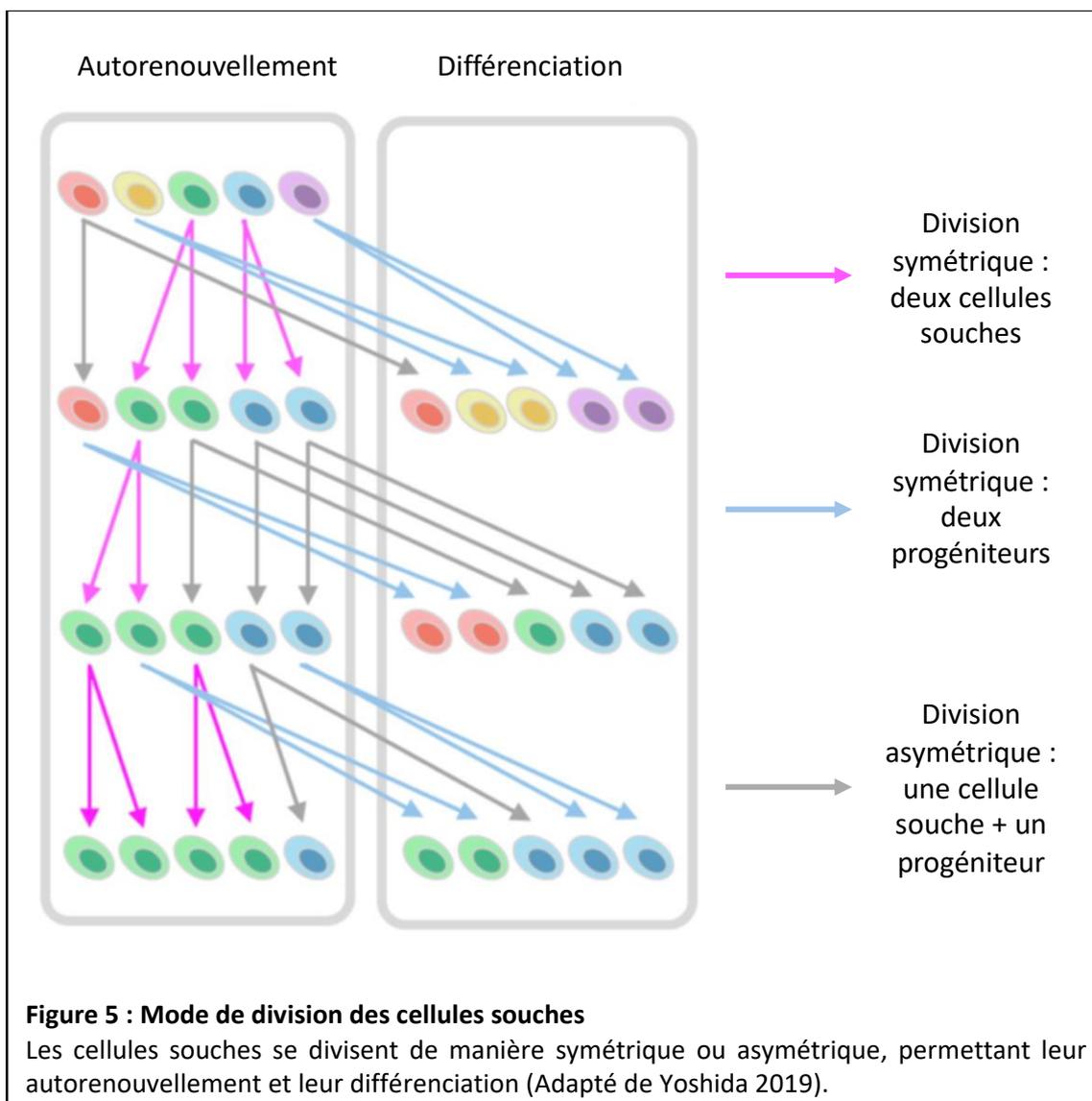
### A) Propriétés générales des cellules souches

#### 1) Autorenouvellement et différenciation : division symétrique et asymétrique

Le mode de division des cellules souches est important pour leur maintien et leur expansion. Il existe deux types de division chez les cellules souches : la division asymétrique et la division symétrique. La capacité de se diviser de façon asymétrique pour donner une cellule souche identique et une cellule fille spécialisée, est considérée comme l'un des attributs du caractère souche (souchitude), et permet le contrôle homéostatique du réservoir de cellules souches. Ce modèle présente donc l'avantage de maintenir la population des cellules souches à un niveau constant, mais pas de se développer en nombre, le rendant incapable de reconstituer son réservoir en cas de perte d'intégrité du tissu. Cette problématique est résolue par le modèle de division symétrique. On retrouve notamment ce modèle de division dans les neuroblastes de la drosophile (Jan and Jan, 2001). Ce modèle permet également l'autorenouvellement des cellules souches et d'engendrer des progéniteurs. En effet, il existe deux types de division symétrique : une division de prolifération qui donne deux nouvelles cellules souches et une division de différenciation qui donne deux cellules progénitrices (Figure 5). Ces deux types de division sont soumis au contrôle de nombreux signaux émanant du tissu environnant, ce microenvironnement est appelé la niche.

Pour la division asymétrique :

- Les mécanismes intrinsèques : ils interviennent dans la répartition du contenu cellulaire, lors de la division. Ces mécanismes comprennent la régulation de l'ensemble des facteurs de polarité cellulaire et la ségrégation régulée des déterminants du destin cellulaire (Tran *et al.*, 2012).
- Les mécanismes extrinsèques : ils sont liés au positionnement de la cellule au sein de la niche. En effet le microenvironnement est propice soit à l'autorenouvellement pour la cellule fille restée dans la niche, soit à la différenciation pour la cellule fille sortie de la niche (Yamashita, Jones and Fuller, 2003).



Pour la division symétrique, le microenvironnement des cellules est responsable de la formation soit de deux cellules souches (lorsqu'elles sont dans la niche) soit de deux cellules progénitrices (lorsqu'elles sortent de la niche). On retrouve la division symétrique majoritairement durant le développement, mais aussi lors de la régénération tissulaire après un dommage. Dans de rares cas, on peut retrouver cette forme de division chez l'adulte en condition d'homéostasie, comme chez les mammifères dans le colon (Yatabe, Tavaré and Shibata, 2001). De manière générale, la division asymétrique prévaut permettant l'homéostasie tissulaire. Enfin chez certains mammifères, on retrouve une alternance entre la division symétrique et asymétrique notamment dans le tissu neural et l'épiderme.

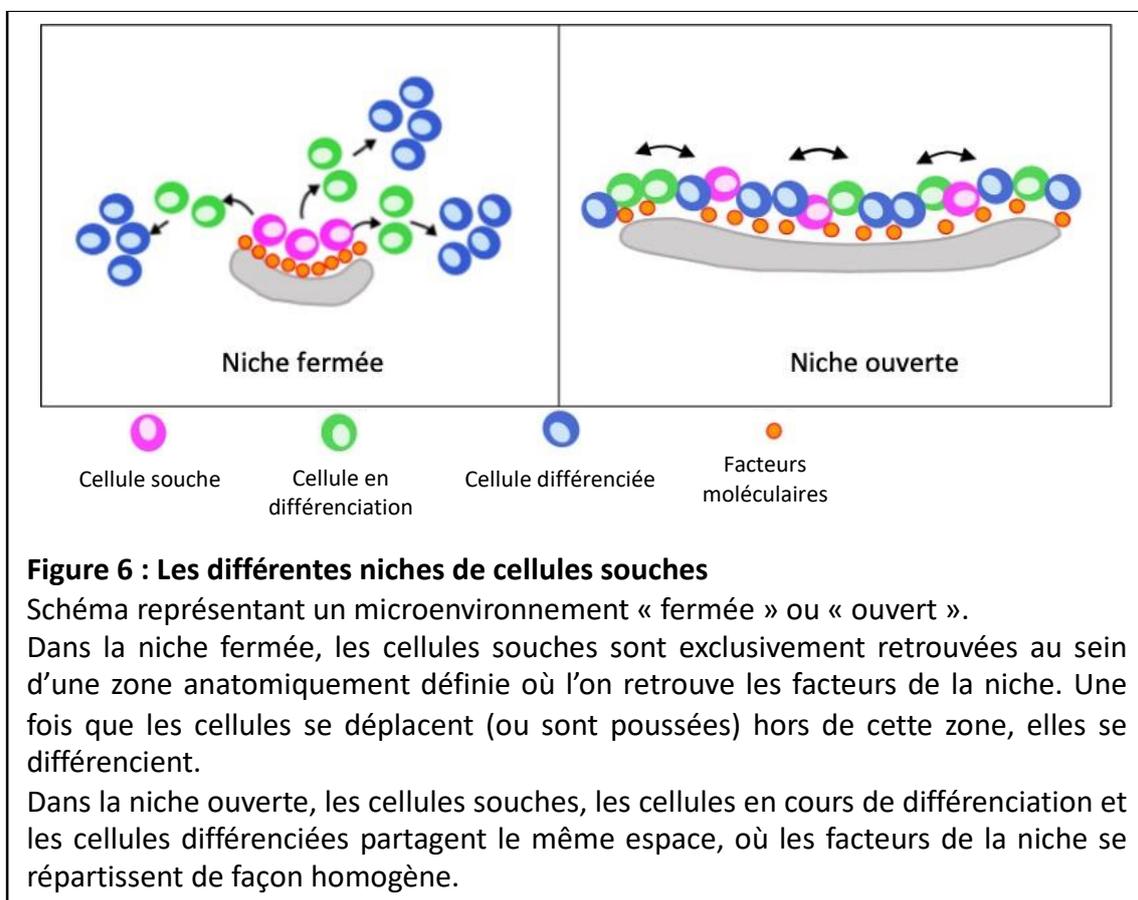
## 2) [La niche des cellules souches](#)

Le microenvironnement où les cellules souches résident, est appelé la niche. De manière générale, la niche est localisée au niveau de la membrane basale dans le tissu adulte, elle est constituée des cellules souches, de leurs progéniteurs, mais aussi de multiples types cellulaires différents ainsi que d'une matrice extracellulaire spécifique. C'est en 1978 que Ray Schofield a formulé pour la première fois l'hypothèse de la niche de cellules souches dans le système hématopoïétique (Schofield, 1978). Les premières caractérisations des composants de la niche ont été réalisées chez des modèles invertébrés, qui sont des organismes plus simples, notamment *Caenorhabditis elegans* et la *Drosophila melanogaster*. L'un des rôles les plus importants de la niche est l'équilibre entre l'homéostasie où les cellules alternent entre autorenouvellement et différenciation, et des situations de non-homéostasie, comme la croissance tissulaire, la régénération après dommage ou encore la transplantation. Ainsi, les signaux de la niche, qui régulent les activités des cellules souches, sont probablement différents selon le stade du développement et dépendent de la situation tissulaire. Il existe actuellement deux modèles de niches décrites dans la littérature (Figure 6) :

- La niche « fermée » ou « définitive », est localisée dans un compartiment fixe dont les limites sont définies. Les cellules souches présentes au sein de cette niche, restent indifférenciées, ne recevant que des signaux d'autorenouvellement. C'est en dehors de la niche que les cellules souches vont pouvoir se différencier. L'accès limité à cette niche permet une stabilité du réservoir de cellules souches. Ainsi, il est probable que

dans ces niches, le destin des cellules souches soit principalement déterminé par la corrélation spatiale entre les cellules souches et la signalisation de la niche (Figure 6). On retrouve des exemples de niches fermées notamment chez les drosophiles dans les testicules et ovaires, et chez les mammifères dans les cryptes intestinales.

- La niche « ouverte », ou « facultative », est décrite dans les tissus dont les limites ne sont pas définies, les cellules souches migrent activement et se mélangent aux progéniteurs. Des interactions entre les niches voisines ont été identifiées : les cellules souches d'une région peuvent migrer vers une autre niche (Figure 6). On retrouve ce genre de niche chez les mammifères, pour les cellules souches hématopoïétiques par exemple (Morrison and Spradling, 2008).



La niche des CSGs dans les testicules des mammifères est considérée comme une niche ouverte ou facultative qui ne peut pas être précisément définie anatomiquement. En raison notamment des fluctuations cycliques de l'expression des régulateurs paracrines, la niche des

CSGs change de nature au cours du cycle épithélial séminifère. Malgré une localisation préférentielle aux zones tubulaires bordant le tissu interstitiel et le système vasculaire, on ne retrouve pas de régions spécifiques où s'accumulent les CSGs, celles-ci sont distribuées de manière homogène sur la membrane basale de l'épithélium chez la souris (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001; Yoshida, Sukeno and Nabeshima, 2007; Hara *et al.*, 2014), contrairement à ce qui est observé dans le testicule de la drosophile. Cette distribution des spermatogonies de souris est étroitement liée à la dynamique des CSGs. Ce choix dépend de l'interaction complexe de divers facteurs au sein de leur niche, qui comprend des cellules somatiques, la matrice extracellulaire et différents facteurs solubles (Oatley and Brinster, 2012). L'équipe de Kitadate, a récemment démontré que la compétition pour certains facteurs de croissance, comme les mitogènes FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) sécrétés par les cellules endothéliales lymphatiques (LECs), qui sont associées au système vasculaire et à l'interstitium, régule la densité et la taille de la population de CSGs au niveau de la membrane basale. Les FGFs sont nécessaires pour l'autorenouvellement des CSGs et la compétition mitogénique entraîne une fluctuation dans la densité de la niche ouverte (Kitadate *et al.*, 2019). Parmi les cellules de la niche, on retrouve les cellules de Sertoli, en raison de leur association physique directe avec les cellules germinales, de leur sécrétion de facteur de croissance comme le GDNF, mais également des composants de la membrane basale, ces cellules sont considérées comme des contributeurs importants de la niche testiculaire. En effet le GDNF, outre son activité mitogène, s'est avéré fonctionner comme un chimioattracteur pour les CSGs isolées, pouvant ainsi stimuler le mouvement de chimiotactisme des CSGs, en fonction des régions de forte concentration du GDNF considérées comme niche (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2012; Dovero *et al.*, 2013). Les cellules de Sertoli produisent aussi les facteurs de croissance FGF2 (*Fibroblast growth factor 2*) (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003), CSF1 (*colony-stimulating factor 1*) (Oatley *et al.*, 2009), les protéines de la famille WNT (*Wingless-Type MMTV Integration Site Family*) (Yeh, Zhang and Nagano, 2011), et la cytokine LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2007), qui sont essentiels à l'autorenouvellement et au maintien des CSGs. D'autres facteurs comme CXCL12 (*C-X-C motif chemokine ligand 12*) et son récepteur apparenté CXCR4 (*C-X-C motif chemokine receptor 4*) possèdent un rôle dans l'orientation des CSGs vers la niche. En effet, la signalisation de CXCL12/CXCR4 entraîne les CSGs vers la membrane basale et pourrait également les empêcher de quitter la niche (Kanatsu-Shinohara

*et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Enfin, on retrouve aussi, l'acide rétinoïque (RA), une hormone qui joue un rôle indispensable dans l'induction de la différenciation des CSGs. L'exposition au RA des spermatogonies ayant amorcé leur différenciation les rend réfractaires aux facteurs dérivés de la niche (Endo *et al.*, 2015).

La plupart des connaissances liées à la régulation paracrine du destin des CSGs proviennent des rongeurs. Cependant, grâce à des études de scRNA-seq (*single cell RNA sequencing*), l'équipe de Guo a pu mettre en évidence cinq types cellulaires présents dans la niche testiculaire chez l'Homme : les cellules de Leydig, myoïdes, Sertoli, endothéliales et macrophages (Guo *et al.*, 2018). L'une des différences importantes avec le modèle murin est l'expression de CXCL12/CXCR4 par les cellules de Leydig et non celles de Sertoli. De plus, les CSGs murines expriment *Csf1r* (*Colony Stimulating Factor 1 Receptor*), récepteur du facteur de croissance CSF1, tandis que l'expression de CSF1R chez l'Homme semble être spécifique aux macrophages.

Ainsi, la niche des CSGs est définie par des critères moléculaires et pas uniquement anatomiques, ainsi que par un microenvironnement qui permet et favorise l'autorenouvellement des CSGs au détriment de l'amorçage de la différenciation.

## B) Fonctions et caractéristiques des cellules souches germinales

### 1) L'unipotence des CSGs ?

Les CSGs sont capables de proliférer en culture, en présence de GDNF, un facteur de croissance produit par les cellules de Sertoli, qui leurs permettent de s'autorenouveler (Meng *et al.*, 2000). Bien qu'unipotentes *in vivo*, les CSGs possèdent une plasticité leur permettant, dans certaines conditions *in vitro*, de dériver en cellules souches germinales multipotentes, comme en 2004 lorsque l'équipe de Kanatsu-Shinohara a développé des cellules ES-like à partir de cultures primaires de CSGs de testicules de souris néonatales (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2006; Seandel *et al.*, 2007). Les CSGs provenant de testicules de souris néonatales ont été cultivées sur un tapis de MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) inactivées, en présence de GDNF, FGF2, LIF et EGF (*epidermal growth factor*). Ces cellules multipotentes partagent différentes caractéristiques avec les cellules ES (*embryonic stem cells*) comme

l'autorenouveaulement, la tumorigénécité (capacité à former des tératomes) mais aussi des anomalies génomiques et épigénétiques. Elles aussi sont capables de former les trois feuillettes embryonnaires (ectoderme/mésoderme/endoderme). Cette transformation de CSGs unipotentes en cellules ES-like pluripotentes se fait *in vitro* spontanément, sans reprogrammation artificielle avec des vecteurs lentiviraux ou plasmides, comme pour les cellules souches pluripotentes induites (iPS). De plus, l'âge des animaux, les conditions de culture et les facteurs de croissance impliqués, la densité cellulaire des CSGs pendant la culture, le délai après le début de la culture et la durée de la culture sont des éléments clés dans le processus de transition (Azizi *et al.*, 2016). En 2007, Seandel et ses collègues génèrent des cellules multipotentes à partir de cultures de CSGs GPR125+ (marqueurs des spermatogonies adultes), provenant de souris âgées de 3 semaines à 8 mois. Ces cellules sont cultivées sur un tapis de cellules stromales CD34+ inactivées provenant du testicule de souris, en présence des facteurs de croissance GDNF, FGF2, LIF et EGF (Seandel *et al.*, 2007). Pour générer des cellules multipotentes à partir de CSGs, Ko et al., établissent l'importance de la densité cellulaire des CSGs dans les cultures *in vitro*. En effet dans un milieu de culture particulier contenant des facteurs de croissance (FGF2, EGF, GDNF) ainsi que des hormones (  stradiol et progestérone), à faible densité (< 8000 cellules), après 4 semaines, certaines CSGs adultes deviennent multipotentes (Ko *et al.*, 2009). Bien qu'il n'y ait pas encore de compréhension complète du mécanisme de reprogrammation et de l'établissement des ES-like à partir de CSGs, certaines pistes ont été suggérées comme l'implication de DMRT1 (*Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) et P53 (*tumor protein 53*) dont l'inhibition empêche la conversion des CSGs en ES-like (Takashima *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré que les CSGs murines étaient réfractaires à la reprogrammation induite par les facteurs de Yamanaka OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*), SOX2 (*sex determining region Y*), C-MYC (*MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*) et KLF4 (*KLF Transcription Factor 4*) (Corbineau *et al.*, 2016).

Si le potentiel de multipotence est admis chez les CSGs murines, il reste encore très débattu chez l'Homme. En effet, en 2008, chez l'Homme, Conrad et al., dans un article maintenant rétracté, ont affirmé que des cellules pluripotentes, appelées cellules souches germinales adultes humaines (haGSC : *human adult germinal stem cells*), pouvaient être

dérivées de testicules humains (Conrad *et al.*, 2008). Par la suite, deux autres publications ont également affirmé que l'obtention de cellules pluripotentes ressemblant à des cellules ES à partir de culture de cellules testiculaires humaines était possible (Golestaneh *et al.*, 2009; Kossack *et al.*, 2009). Cependant, ces affirmations ont été remises en question par Ko *et al.*, qui affirme que ces cellules n'étaient pas pluripotentes, en cause : leur incapacité à générer des tératomes (Ko *et al.*, 2011). De plus, une autre étude affirme que ces cellules pluripotentes dériveraient de cellules somatiques mésenchymateuses et non de cellules germinales (Chikhovskaya *et al.*, 2014).

## 2) [Méthodologies d'analyse et d'identification des CSGs](#)

La caractérisation et l'étude expérimentale des CSGs sont restées longtemps complexes. En effet, ces cellules sont rares et difficiles à distinguer des progéniteurs qu'elles produisent. Les premières expériences d'identification des spermatogonies ont été réalisées par histologie et par *whole mount* chez l'Homme (Clermont and Leblond, 1959; Clermont, 1966b, 1966a) et chez les rongeurs (Huckins, 1971b, 1971a; Oakberg, 1971b; de Rooij, 1973). Ces techniques reposent sur la coloration à l'hématoxyline, permettant la coloration nucléaire et à l'éosine permettant la coloration cytoplasmique (HE). Elles ont permis l'observation des différents types cellulaires présent dans les tubes séminifères, et de reconnaître une hiérarchie allant des cellules isolées à des chaînes de spermatogonies (2-4-8-16), au sein des cellules germinales en fonction du nombre de cellules présent dans les chaînes de spermatogonies. Cependant ces techniques ne permettent pas de distinguer clairement le pool de cellules souches au sein des spermatogonies.

Ces méthodes élémentaires et fiables, ont donc fait place à de nouvelles procédures plus complexes. Ces méthodes sont basées sur l'utilisation de marqueurs spécifiques des CSGs et des progéniteurs spermatogoniaux. La description de ces marqueurs est présentée en détail dans le chapitre suivant (page 35).

La transplantation, utilisée pour la première fois en 1994 par Brinster et ses collègues, est aujourd'hui encore l'une des méthodes les plus employées dans l'études des CSGs (Brinster and Avarbock, 1994; Brinster and Zimmermann, 1994). Elle est devenue la méthode de

référence pour affirmer que les cellules transplantées, ayant la capacité biologique de restaurer la spermatogenèse, sont des cellules souches. En bref, à partir de testicules d'animaux donneurs, les cellules germinales isolées sont transplantées par micro-injection dans les tubes séminifères de testicules de souris infertiles receveuses. L'infertilité des cellules receveuses peut être induite expérimentalement par un traitement busulfan (Brinster and Zimmermann, 1994) ou encore due à une mutation génétique (Ogawa *et al.*, 2000). Ces cellules vont coloniser les tubes séminifères et restaurer la spermatogenèse deux mois après transplantation. Les spermatozoïdes dérivés du donneur sont morphologiquement normaux et sont capables de fertiliser un ovule et de donner une descendance fertile possédant l'haplotype du donneur. Ces études sont facilitées par la disponibilité de cellules provenant de donneurs transgéniques chez la souris (LacZ et GFP) permettant une identification aisée des cellules germinales dérivées des CSGs injectées dans le testicule de la souris receveuse.

La transplantation des CSGs humaines dans les tubules séminifères des souris immunodéficientes ne permet pas de régénérer une spermatogenèse. Cependant les spermatogonies humaines peuvent coloniser et se maintenir dans les tubules séminifères plusieurs mois (Nagano, McCarrey and Brinster, 2001; Nagano, Patrizio and Brinster, 2002; Sadri-Ardekani *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Dovey *et al.*, 2013; Valli *et al.*, 2014). L'observation de chaînes de spermatogonies indifférenciées dans le testicule receveur, témoigne de la fonctionnalité des cellules souches transplantées.

Si la transplantation est un test fonctionnel et quantitatif pour caractériser le potentiel souche des cellules dans la population transplantée, il devient évident que cette méthode souffre d'une limitation critique. En effet, cette méthode ne permet pas d'étudier le maintien du pool de CSGs *in situ* en condition homéostatique. Étant donné les limites de la transplantation, le marquage génétique des cellules et de leurs progéniteurs (transgène rapporteur) par des méthodes de *lineage tracing* (marquage pulsé), représente une approche expérimentale intéressante pour évaluer l'activité des cellules souches *in vivo* en homéostasie (Nakagawa, Nabeshima and Yoshida, 2007; Nakagawa *et al.*, 2010). Le système transgénique inducible *CreER* est utilisé dans les études de *lineage tracing*. L'induction par le tamoxifène de l'expression de la CRE permet l'excision d'une séquence stop située en amont du gène rapporteur. On a alors une expression permanente de ce gène, par exemple LACZ ou GFP, dans les cellules respectives et dans toute la descendance. Ainsi, la persistance à long terme de

clones de cellules marquées dans le testicule indique la présence de cellules souches parmi ces cellules en condition homéostasique. Cette méthode a permis l'identification des marqueurs de spermatogonies indifférenciées tels que BMI1 (*B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1*) (Komai *et al.*, 2014), GFR $\alpha$ 1 (Hara *et al.*, 2014), ID4 (*Inhibitor Of DNA Binding 4*) (Helsel *et al.*, 2017), NANOS2 (Sada *et al.*, 2009), PAX7 (*Paired Box 7*) (Aloisio *et al.*, 2014), et NGN3 (*Neurogenin-3*) (Nakagawa, Nabeshima and Yoshida, 2007).

Ces deux méthodes sont donc essentielles pour l'analyse des CSGs. En effet, la transplantation permet une analyse quantitative détaillée de l'activité des cellules souches dans les populations cellulaires testées, alors que la technique de *lineage tracing* fournit une analyse de la fonction des CSGs dans des conditions homéostatiques sur une longue période. Ces deux approches ont permis de mieux comprendre et définir les CSGs et souligner le rôle que peuvent jouer les progéniteurs dans la régénération du lignage germinal. De même des expériences de microscopie intravitale dans des souris transgéniques dont les spermatogonies expriment un marqueur fluorescent (NGN3-EGFP, GFR $\alpha$ 1-EGFP par exemple) ont été réalisées. Elles consistent à étudier le devenir *in vivo* des spermatogonies, à la surface des tubules séminifères situés en dessous de l'albuginé. Cette méthode permet d'observer le devenir des cellules (mitose, apoptose, fragmentation de chaînes de spermatogonies ...) et la dynamique de ces cellules sur une période de trois jours (Yoshida, Sukeno and Nabeshima, 2007; Hara *et al.*, 2014).

Enfin depuis quelques années, l'avènement des technologies omiques permet le séquençage de cellules uniques. Le scRNA-seq permet d'établir le profil transcriptionnel de cellules de façon individuelle. Cette méthode apporte de nouvelles données sur une cellule unique, les gènes exprimés, leur quantité et comment ils diffèrent entre les cellules d'un échantillon hétérogène. La population souche au sein des spermatogonies étant encore mal définie, notamment chez l'Homme, cet outil s'est révélé très pertinent dans l'étude des CSGs. Le scRNA-seq a permis l'étude de la spermatogenèse aux différents stades de vie de la souris (néonatal à adulte) ainsi que la classification des spermatogonies et de même chez l'Homme (Guo *et al.*, 2017; Hermann *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019a; Guo *et al.*, 2020; Shami *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021; Di Persio *et al.*, 2021). Cette nouvelle approche permet de mettre en

évidence différentes sous-populations au sein des spermatogonies ainsi que l'apparition d'une hiérarchie. Cependant, elle ne permet pas de tester le potentiel souche des populations identifiées à l'aide de tests fonctionnels.

### C) Les marqueurs des CSGs murines et humaines

#### 1) Les marqueurs membranaires

La concentration des CSGs au sein du testicule étant très faible, leur identité reste difficile à déterminer. Les marqueurs membranaires des CSGs présentent l'avantage de pouvoir purifier des cellules viables les exprimant, afin de les transplanter et de tester leur capacité à régénérer une spermatogenèse (purification par tri cellulaire FACS : *fluorescent activated cell sorting* ou MACS : *magnetic activated cell sorting*). On retrouve de nombreux marqueurs de surface des spermatogonies exprimés à la fois chez la souris et l'humain.

Les spermatogonies expriment différents marqueurs à leur surface comme THY1 (ou CD90 : *Cluster of Differentiation 90*), une protéine de surface cellulaire ancrée au glycoposphatidylinositol appartenant à la famille des immunoglobulines. THY1 a été identifié comme un marqueur conservé des spermatogonies indifférenciées chez les rongeurs, les primates non-humains et les humains (Kubota, Avarbock and Brinster, 2003; Hermann *et al.*, 2009; Givélet *et al.*, 2022). L'intégrine  $\alpha 6$  est retrouvé à la fois chez l'humain et la souris (Shinohara, Avarbock and Brinster, 1999; Valli *et al.*, 2014). Les corécepteurs GFR $\alpha 1$  et RET au facteur de croissance GDNF, nécessaires pour l'autorenouvellement des CSGs, sont retrouvés à la surface des spermatogonies indifférenciées chez l'Homme et la souris (Naughton *et al.*, 2006; Grisanti *et al.*, 2009; Hara *et al.*, 2014; Garbuzov *et al.*, 2018). Dans les deux espèces, d'autres marqueurs de surface tel que KIT (*KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*), le récepteur au SCF (*Stem cell factor*) permettent de discriminer négativement les spermatogonies indifférenciées (Schrans-Stassen *et al.*, 1999). On retrouve aussi à la surface des spermatogonies la protéine BRCP1 (*breast cancer resistance protein*) ou ABCG2 qui fait partie de la famille des transporteurs à cassettes liant l'ATP, permettant un transport actif de molécules hors du cytoplasme de la cellule en opposition au gradient de concentration. Ce transporteur est intéressant pour les spermatogonies car il exclut le colorant de l'ADN Hoeschst 33342, permettant ainsi de distinguer une population appelée « side population »

contenant les spermatogonies (Lassalle *et al.*, 2004a; Givelet *et al.*, 2022). Un nouveau marqueur, PLVAP (Plasmalemma Vesicle Associated Protein), a récemment été identifié permettant d'établir une hiérarchie au sein de la population hétérogène des spermatogonies indifférenciées GFR $\alpha$ 1 positives chez la souris (Nakagawa *et al.*, 2021). Chez l'Homme, deux nouveaux marqueurs TSPAN33 (*Tetraspanin 33*) et PLPPR3 (*Phospholipid Phosphatase Related 3*) ont été décrits comme exprimé dans les CSGs. Les populations spermatogoniales positives pour ces marqueurs sont capables de régénérer un début de spermatogenèse après transplantation (Shami *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020). Le marqueur de stade de la pluripotence SSEA4 (*stage-specific embryonic antigen-4*) marque une population qui a une capacité de régénération (Izadyar *et al.*, 2011). D'autres marqueurs sont décrits dont la liste qui se trouve dans le tableau 1.

Modèle murin			Modèle Humain		
Marqueurs	Localisation	Référence	Marqueurs	Localisation	Référence
$\alpha$ 6 intégrine	M	Shinohara, Avarbock, et Brinster 1999	$\alpha$ 6 intégrine	M	Valli et al. 2014
$\beta$ 1 intégrine	M	Shinohara, Avarbock, et Brinster 1999	CD9	M	Zohni et al. 2012
BMI1	N/C	Komai et al. 2014	EpCAM	M	Dovey et al. 2013
BRCP1	M	Lassalle et al. 2004	FGFR3	M	von Kopylow et al. 2010, 2012
CD9	M	Kanatsu-Shinohara, Toyokuni, et Shinohara 2004	GFR $\alpha$ 1	M	Grisanti et al. 2009
E-cadhérine	M	Tokuda et al. 2007	GPR125	M	Nickkholgh et al. 2014
EOMES	N/C	Sharma et al. 2019	ID4	N/C	Sachs et al. 2014
EpCAM	M	Kanatsu-Shinohara et al. 2011	KIT	M	Di Persio et al. 2017
GFR $\alpha$ 1	M	Hara et al. 2014	MAGEA-4	N/C	Di Persio et al. 2017
GPR125	M	Seandel et al. 2007	PIWIL4	N/C	Guo et al. 2020; Shami et al. 2020
ID4	N/C	Sun et al. 2015	PLPPR3	M	K. Tan et al. 2020
KIT	M	Kubota, Avarbock, et Brinster 2003	PLZF	N/C	Sadri-Ardekani et al. 2009
LIN28	N/C	Chakraborty et al. 2014	SSEA-4	M	Izadyar et al. 2011
MCAM	M	Kanatsu-Shinohara, Morimoto, et Shinohara 2012	THY1 (CD90)	M	Valli et al. 2014
MIWI2	N/C	Carrieri et al. 2017	TSPAN33	M	Shami et al. 2020
NANO2	N/C	Sada et al. 2009	UCHL1	N/C	Di Persio et al. 2017
NGN3	N/C	Nakagawa et al. 2010	UTF1	N/C	von Kopylow et al. 2010
OCT4	N/C	Komai et al. 2014	VASA	N/C	Castrillon et al. 2000
PAX7	N/C	Aloisio et al. 2014			
PDX1	N/C	La et al. 2018			
PLVAP	M	Nakagawa et al. 2021			
PLZF	N/C	Buass et al. 2004			
RET	M	Garbuzov et al., 2018			
SHISA6	N/C	Tokue et al. 2017;			
SOHLH1	N/C	Ballow et al. 2006; Suzuki et al. 2012			
SOHLH2	N/C	Toyoda et al. 2009; Suzuki et al. 2012			
THY1 (CD90)	M	Kubota, Avarbock, et Brinster 2003			
UTF1	N/C	Zhou et al. 2015			
VASA	N/C	Tanaka et al. 2000			

**Tableau 1** : Différents marqueurs membranaires (M), nucléaires et cytoplasmiques (N/C) des spermatogonies, retrouvés dans le modèle murin et humain. Les marqueurs spécifiques de la lignée germinale sont indiqués en orange.

Des combinaisons de différents marqueurs ont permis d'identifier des population très enrichies en CSGs telles que (MHC-I)<sup>-</sup> THY-1<sup>+</sup> c-KIT<sup>-</sup> et  $\beta$ 2-M<sup>-</sup> THY1<sup>+</sup>  $\alpha$ 6<sup>+</sup> par l'équipe de Brinster (Kubota, Avarbock and Brinster, 2003, 2004), SP  $\alpha$ 6<sup>+</sup> c-KIT<sup>-</sup> (Barroca *et al.*, 2009a), E-Cadh<sup>+</sup> KIT<sup>-</sup> GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> PLVAP<sup>+</sup> (Nakagawa *et al.*, 2021) chez la souris, et THY1<sup>dim</sup> EPCAM<sup>dim</sup>  $\alpha$ 6<sup>+</sup> (Valli *et al.*, 2014; Hermann *et al.*, 2018) et  $\beta$ -2M<sup>-</sup> SP  $\alpha$ 6<sup>+</sup> THY1<sup>+</sup> (Givelet *et al.*, 2022) chez l'humain.

## 2) [Les marqueurs cytoplasmiques et nucléaires](#)

Les marqueurs cytoplasmiques et nucléaires ont été identifiés soit par la technique de *lineage tracing* soit par marquage immunohistochimique en *whole-mount*. Ces méthodes ont permis la mise en évidence de marqueurs comme VASA (ou DDX4) qui marquent toute la population germinale chez la souris et l'humain (Castrillon *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000). D'autres facteurs de transcription ont été mis en évidence comme PLZF qui est exprimé chez la souris dans les spermatogonies A<sub>al</sub> à A<sub>s</sub> (Buaas *et al.*, 2004). Il est aussi retrouvé dans les spermatogonies chez l'humain (Sadri-Ardekani *et al.*, 2009). Le facteur ID4 est très important car il différencie chez la souris les spermatogonies les plus indifférenciées. En effet, il est présent sous forme de gradient dans les spermatogonies A<sub>s</sub>, et n'est plus retrouvé dans les spermatogonies A<sub>pr</sub> et A<sub>al</sub>, dans un modèle de souris transgénique *Id4-EGFP*. Au sein des spermatogonies A<sub>s</sub>, celles qui expriment ID4<sup>bright</sup> sont considérées comme étant les cellules souches (Sun *et al.*, 2015; Hesel *et al.*, 2017), même si l'expression unique d'ID4 dans les spermatogonies A<sub>s</sub> reste controversée (La, Chan, *et al.*, 2018; La, Mäkelä, *et al.*, 2018; Kitadate *et al.*, 2019). Un autre marqueur important des spermatogonies est NGN3, qui permet de différencier les spermatogonies souches des progéniteurs (Nakagawa *et al.*, 2010). ID4 a aussi été retrouvée exprimée chez l'humain (Sachs *et al.*, 2014). SOHL1 et 2 (*Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1 et 2*) sont exprimés dans les spermatogonies indifférenciées GFR $\alpha$ 1 négatives, et sont importants pour leur différenciation chez la souris (Ballow *et al.*, 2006; Toyoda *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2012). Les facteurs de transcription OCT4, SOX3 et LIN28 sont exprimés dans les spermatogonies indifférenciées, mais ils définissent un état engagé vers la différenciation comme les spermatogonies NGN3 positives (Chakraborty *et al.*, 2014; La, Chan, *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2019; Nakagawa *et al.*, 2021).

Chez l'Homme, deux types de spermatogonies ont été identifiés : A<sub>dark</sub> et A<sub>pale</sub>, distinctes par la morphologie du noyau et l'intensité de la coloration à l'hématoxyline. Les

spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  et  $A_{\text{pale}}$  sont retrouvées à la membrane basale des tubules séminifères. Les spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  sont relativement petites, sphériques ou légèrement ovoïdes. Leur noyau contient une chromatine sombre et dense. Les spermatogonies  $A_{\text{pale}}$  relativement plus grandes et ovales, voir presque rondes. Elles possèdent un noyau pâle et allongé, dont la chromatine est granuleuse (Clermont and Leblond, 1959; Clermont, 1966b). Les spermatogonies  $A_{\text{pale}}$  mûrent en spermatogonies de type B qui se divisent ensuite en spermatocytes pour produire les spermatozoïdes. Les spermatogonies B qui sont identifiables par leur plus grande taille, elles possèdent un noyau clair et arrondi. Chez l'Homme, on retrouve MAGEA4 (*Melanoma-Associated Antigen 4*) qui marque toutes les spermatogonies, et l'enzyme UCHL1 (*ubiquitin C-terminal hydrolase L1*) qui marque les spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  et  $A_{\text{pale}}$  (Di Persio *et al.*, 2017). Enfin, le facteur transcription UTF1 (*Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1*) est exprimé par les spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  et  $A_{\text{pale}}$  humaines et les spermatogonies murines (von Kopylow *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2015). PIWIL4, un membre de la famille des Argonautes (*Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 4*) (ou HIFI2 ou MIWI2) est un petit ARN qui réprime l'expression génique, il est exprimé dans les spermatogonies murines NGN3 positives (Yoshida, 2018), il est nécessaire à la restauration de la spermatogenèse en cas de dommage sur le lignage germinale murin (Carrieri *et al.*, 2017). Il est décrit comme un des marqueurs des spermatogonies les plus primitives dans les études de scRNAseq humaines, il a notamment été retrouvé dans les spermatogonies quiescentes  $UTF1^+ GFR\alpha 1^{\text{low}}$  (Guo *et al.*, 2020; Shami *et al.*, 2020). Dans ces études, les spermatogonies les plus primitives sont définies comme  $GFR\alpha 1^{\text{low}} UTF1^{\text{high}} FGFR3^{\text{high}} TSPAN33^{\text{high}} SSEA4^{\text{low}}$ . D'autres marqueurs nucléaires et cytoplasmiques sont décrits dont la liste se trouve dans le tableau 1.

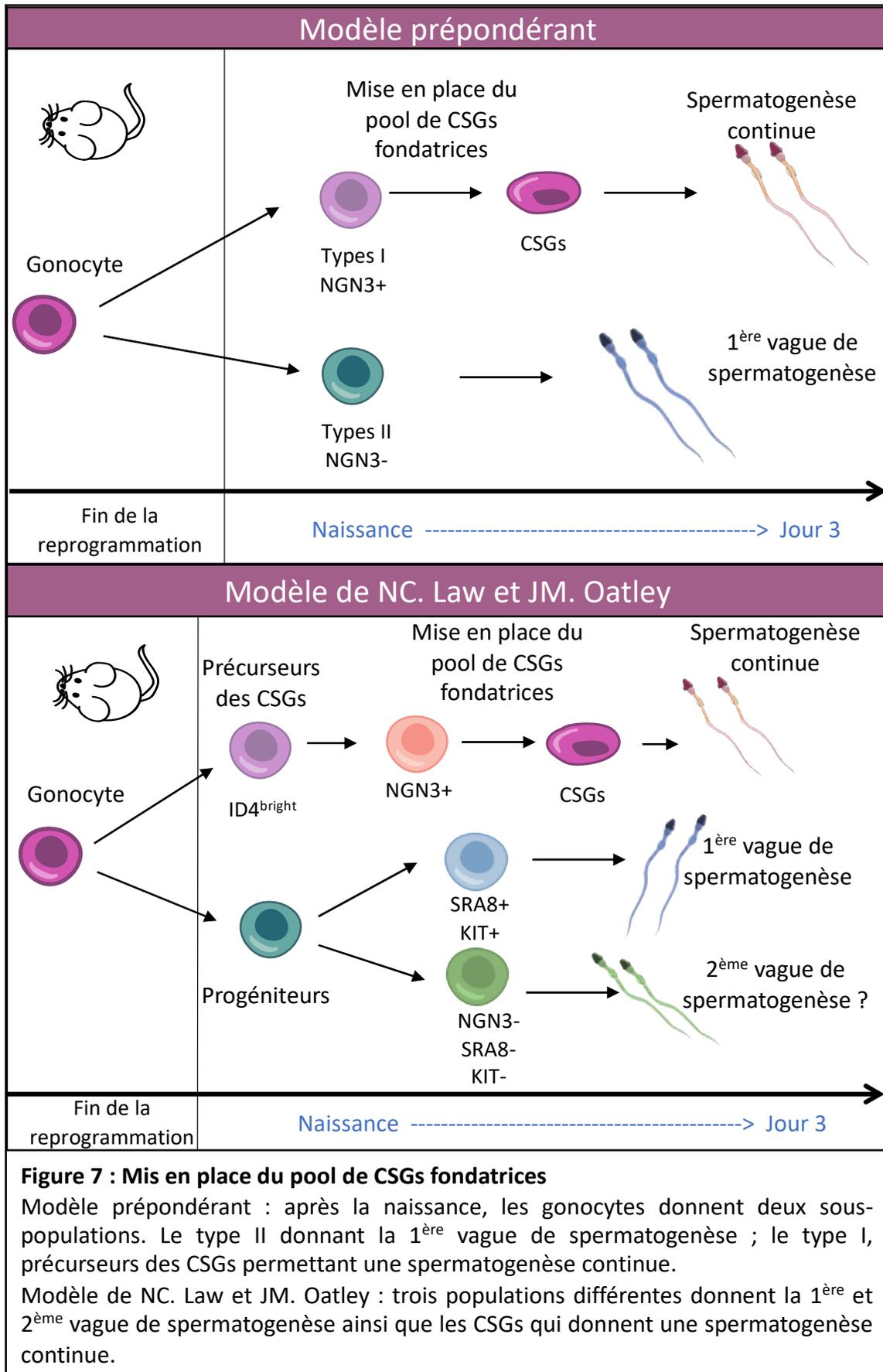
#### D) Autorenouvellement et différenciation des CSGs chez la souris

##### 1) Mise en place du pool de CSGs chez la souris prépubère

Chez la souris, après la naissance, on assiste à la première vague de spermatogenèse. Elle commence dans le testicule postnatal et culmine avec la formation des premiers spermatozoïdes. C'est au cours de cette période de développement que les populations de cellules germinales et somatiques se forment. Après la naissance, les gonocytes réintègrent progressivement le cycle cellulaire, et migrent alors vers la membrane basale. Kluin et de Rooij

définissent deux sous-types de gonocytes selon une observation de coupe histologique des testicules de souris néonatales (Kluin and de Rooij, 1981). Au sein de ces sous-types, seule une partie de la lignée germinale formera finalement des CSGs chargées de maintenir la lignée spermatogénique entière jusqu'à l'âge adulte. Les gonocytes de types I ressemblent à des spermatogonies indifférenciées et représentent environ 30% de la population. Ces cellules sont NGN3 positives et établissent la future population de CSGs adultes (Yoshida *et al.*, 2006). Les gonocytes de type II ressemblent à des spermatogonies en cours de différenciation et représentent environ 70% de la population, elles sont négatives à la NGN3 et forment une population de spermatogonies en cours de différenciation qui contribuent à un premier cycle de la spermatogenèse (Figure 7).

Une récente étude a montré l'existence d'une spécification en deux temps pour passer des gonocytes aux spermatogonies. Entre E16,5 et la naissance, les gonocytes entrent dans une phase de programmation. Pendant cette phase, on observe deux sous populations de gonocytes quiescents. L'expression des gènes nécessaires à la fonction postnatale des CSGs est élevée dans l'une des deux sous-populations, notamment *Etv5*, *Id4*, *Gfra1*, *Lhx1* et *Ret* (Jain *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Oatley, Avarbock and Brinster, 2007). Dans la deuxième sous-population, l'expression des gènes associés aux progéniteurs ou à la différenciation est plus élevée, notamment *Sohlh1* et *Sox3* (Ballow *et al.*, 2006; Laronda and Jameson, 2011). Le potentiel souche au sein des gonocytes se limite à la première sous-population, ce qui indique que le destin postnatal est programmé pendant cette période (Helsel *et al.*, 2017; Law and Oatley, 2020). Après la naissance, la lignée germinale entre dans une phase d'établissement, qui se déroule entre la naissance et le jour 3 (3dpp : 3<sup>ème</sup> jour post-partum). On retrouve la première sous-population exprimant *Id4*, qui après une brève période d'autorenouvellement constitue la population fondatrice des futures CSGs adultes. En revanche, la deuxième sous-population est programmée pour entrer directement en différenciation. Cette sous-population est composée de deux types de spermatogonies, des spermatogonies indifférenciées exprimant *Stra8* et *Kit* qui vont donner la première vague de spermatogenèse, et des spermatogonies « *progenitor-like* » qui sont *Ngn3*<sup>-</sup>, *Stra8*<sup>-</sup> et *Kit*<sup>-</sup> qui formerait une deuxième vague de spermatogenèse (Law and Oatley, 2020).



Il a été également décrit, dans la population de spermatogonies indifférenciées un état d'amorçage de la différenciation, dans lequel l'expression élevée d'*Oct4* est corrélée à une expression plus faible des facteurs d'autorenouvellement, à une expression plus élevée de *Rarg* et à une réactivité accrue à l'acide rétinoïque (Liao *et al.*, 2019). Également, il a été montré que l'expression du transgène *Stra8-Cre* était effectif dans les spermatogonies indifférenciées fondatrices du futur pool de cellules souches adultes (Sadate-Ngatchou *et al.*, 2008).

## 2) [Les trois différents modèles de régulation des CSGs adultes](#)

- Modèle « classique » : c'est un modèle hiérarchique

La souris est le modèle de CSGs le mieux caractérisé chez les mammifères. Dans le testicule de souris adulte, on retrouve environ 3000 à 4000 CSGs (Nagano, 2003). En 1971, Claire Huckins propose un modèle de renouvellement et de différenciation des CSGs qui sera le modèle prévalant pendant les 40 années suivantes. C'est le modèle dit « classique », qui est un modèle hiérarchique. Il a été développé par observation en *whole-mount* de différents modèles (rat – souris – humain) des tubules séminifères, permettant une meilleure étude de l'organisation des spermatogonies localisées à la membrane basale des tubules (Clermont and Bustos-Obregon, 1968; Huckins, 1971b; Oakberg, 1971a).

Les CSGs font partie de la sous-population la plus immature de spermatogonies, appelé spermatogonie de type A. Ce groupe comprend les spermatogonies isolées : les  $A_{single}$  ( $A_s$ ). Les  $A_s$  se divisent une fois tous les  $\sim 3$  jours et représentent 0,03% (Tegelenbosch and de Rooij, 1993) des cellules germinales dans le testicule de souris. Les  $A_s$  ont un double rôle : le maintien d'un état stable de leur stock par autorenouvellement, donnant deux nouvelles cellules souches, ou des doublets de spermatogonie qui vont s'engager de façon définitive et irréversible vers la différenciation, et perdre leur potentiel souche. Une division mitotique comprenant une cytokinèse incomplète des spermatogonies  $A_s$  va entraîner la formation de ces doublets de cellules interconnectées par des ponts cytoplasmiques : les spermatogonies  $A_{paired}$  ( $A_p$ ) (Figure 8). Elles-mêmes vont donner des progéniteurs composés de chaînes de 4 à 16 cellules interconnectées, les spermatogonies  $A_{aligned}$  ( $A_{al}$ ). La chaîne de 16 spermatogonies va se transformer en type  $A_1$ , donnant successivement les  $A_2$  -  $A_3$  -  $A_4$  - *Intermediate* (In) et enfin les spermatogonies B se situant juste avant la phase de pré-leptotène et la méiose. Ce modèle classique à l'origine se distingue donc par la compartimentation en 3 étapes succinctes

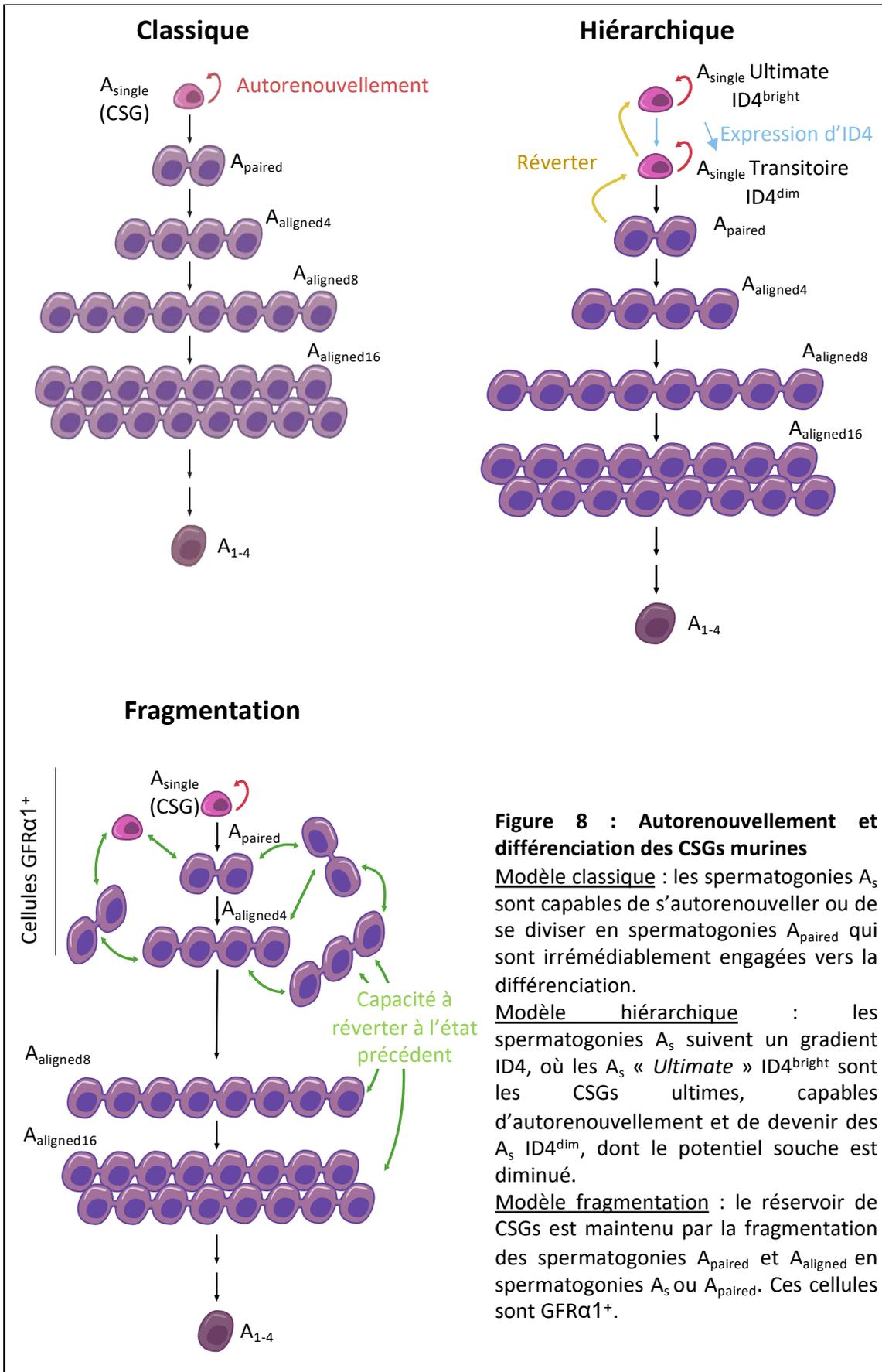
de ce début de spermatogenèse : le compartiment des cellules souches avec les spermatogonies  $A_s$ , le compartiment de prolifération avec les spermatogonies  $A_p$  et  $A_{al}$  et enfin le compartiment de différenciation avec les spermatogonies  $A_1$  à B (Huckins, 1971b). Dans son modèle chez la souris, De Rooij observe un taux de prolifération plus faible que chez les progéniteurs, leur cycle cellulaire étant considérablement plus long. Il propose donc que les spermatogonies indifférenciées ( $A_s/A_{pr}/A_{al}$ ) seraient pour la majorité quiescentes, la prolifération commencerait au passage du stade  $A_{al}$  à  $A_1$  (de Rooij, 1998).

En 1971 Claire Huckins se pose déjà la question suivante : les spermatogonies  $A_p$  et  $A_{al}$  dans le compartiment de prolifération peuvent-elles alimenter en cellules le compartiment des cellules souches ? Ces 15 dernières années, le groupe de Yoshida apporte une possible réponse en introduisant un nouveau modèle : le modèle dit de fragmentation (Figure 8).

- Modèle « fragmentation »

Le groupe de Yoshida propose un autre modèle, où les spermatogonies  $A_p$  et  $A_{al}$  ne sont pas engagées de façon définitive dans la différenciation, venant donc en contradiction avec le modèle « classique ». C'est le modèle dit de « fragmentation » ou modèle « dynamique ».

Dans leur étude, ils se sont intéressés au  $GFR\alpha 1$  qui marque la population spermatogoniale la plus indifférenciée. Par des expériences de *lineage tracing*, utilisant des souris  $GFR\alpha 1-CreER^{T2};CAG-CAT-EGFP$ , ils ont observé, dans des conditions homéostatiques, que la population de spermatogonies  $GFR\alpha 1^+$  se comporte en cellules souches (Hara *et al.*, 2014). Ils ont ensuite utilisé une technique de microscopie intravitale, leur permettant d'étudier le comportement des spermatogonies  $GFR\alpha 1^+$  *in vivo* dans les testicules de souris. Par cette observation, ils ont noté que les  $GFR\alpha 1^+$  ne se divisaient que très peu en deux nouvelles cellules disjointes  $A_s$ . Au contraire, la grande majorité des spermatogonies  $GFR\alpha 1^+$   $A_s$  donnent des  $A_{pr}$  par une division syncytiale incomplète. De plus, cette étude en direct a permis l'observation *in vivo* de la dynamique des cellules  $GFR\alpha 1^+$ . Contrairement au modèle régulier attendu, les spermatogonies  $A_{al-4}$  sont capables de se fragmenter en toutes les combinaisons possibles, produisant  $4x A_s$ ,  $2x A_{pr}$ ,  $2x A_s + A_{pr}$ , ou  $A_s + A_{al-3}$ . Ainsi, ils observent une fragmentation stochastique des ponts intracellulaires, concluant que par cette fragmentation, les spermatogonies syncytiales contribuent à la réserve de cellules souches.



**Figure 8 : Autorenewement et différenciation des CSGs murines**

Modèle classique : les spermatogonies  $A_s$  sont capables de s'autorenewer ou de se diviser en spermatogonies  $A_{\text{paired}}$  qui sont irrémédiablement engagées vers la différenciation.

Modèle hiérarchique : les spermatogonies  $A_s$  suivent un gradient ID4, où les  $A_s$  « *Ultimate* »  $ID4^{\text{bright}}$  sont les CSGs ultimes, capables d'autorenewement et de devenir des  $A_s$   $ID4^{\text{dim}}$ , dont le potentiel souche est diminué.

Modèle fragmentation : le réservoir de CSGs est maintenu par la fragmentation des spermatogonies  $A_{\text{paired}}$  et  $A_{\text{aligned}}$  en spermatogonies  $A_s$  ou  $A_{\text{paired}}$ . Ces cellules sont  $GFR\alpha1^+$ .

De plus, ils ont suivi le comportement des spermatogonies indifférenciées *Ngn3* positives engagées vers la différenciation, et des spermatogonies *Gfra1* positives qui marquent la population la plus indifférenciée (Nakagawa *et al.*, 2010). Ils observent que les spermatogonies  $A_s$  se divisent essentiellement en  $A_{pr}$ , et que certaines spermatogonies  $A_p$  et  $A_{al}$  exprimant *Ngn3* étaient capables de se fragmenter en chaînes plus courtes, ou en cellules individualisées (dont certaines peuvent ré-exprimer le  $GFR\alpha 1$ ). Bien que *Ngn3* soit un marqueur de la différenciation, il semble que certaines cellules *Ngn3*-positives soient capables de faire un retour en arrière et de retrouver un potentiel souche. Ils montrent ainsi une hétérogénéité du potentiel souche entre les différentes sous-populations de spermatogonies indifférenciées. D'autre part les spermatogonies différenciées KIT-positives semblent capables de se dé-différencier et de retrouver un potentiel souche après transplantation (Barroca *et al.*, 2009a), mais avec une plus faible efficacité que les spermatogonies KIT-négatives.

Ce processus serait prépondérant lors de la régénération après un dommage ou une transplantation. En effet lorsque l'homéostasie tissulaire du testicule est intacte, l'activité souche est alors essentiellement limitée aux spermatogonies  $GFR\alpha 1^+$  et les spermatogonies *Ngn3*<sup>+</sup> se différencient généralement en  $A_1$ , une petite minorité seulement fonctionnant comme des CSGs (Yoshida, 2019). Par opposition, une fois le tissu endommagé, elles sont capables de se transformer en cellules souches et régénérer la spermatogenèse.

- Modèle « hiérarchique » au sein des spermatogonies  $A_s$

Une nouvelle hiérarchie entre les spermatogonies  $A_s$  a été proposée par l'équipe d'Oatley, révélant une hétérogénéité dans leur capacité à s'autorenouveler (Helsel *et al.*, 2017). Ils ont mis en évidence un nouveau marqueur : l'inhibiteur de la différenciation 4 (ID4), qui permet d'isoler les spermatogonies  $A_s$  dans les testicules de souris, et joue un rôle important dans l'autorenouvellement des CSGs. Pour cela, une lignée de souris transgéniques, où les cellules exprimant ID4 sont marquées par la protéine fluorescente verte (GFP), a été mise en place. Leur étude a montré que l'expression du transgène *Id4-gfp* dans les spermatogonies indifférenciées est limitée à un sous-ensemble rare de spermatogonies  $A_s$   $GFR\alpha 1^+/PLZF^+$  dans le testicule de souris adultes (~2%). En revanche, la proportion de spermatogonies ID4 est plus abondante, au début du développement postnatal (93% des

cellules PLZF<sup>+</sup> sont ID4<sup>+</sup>). L'une des caractéristiques déterminantes des cellules souches germinales est la capacité à régénérer la spermatogénèse. Après transplantation de spermatogonies d'ID4-GFP<sup>+</sup> et ID4-GFP<sup>-</sup> provenant de culture primaire, ils notent que la capacité de régénération est essentiellement limitée à la population ID4<sup>+</sup>, indiquant que les CSGs sont ID4<sup>+</sup> et que les cellules indifférenciées restantes ID4<sup>-</sup> sont des progéniteurs engagés (Chan *et al.*, 2014).

Une autre étude utilisant une lignée *Id4-tdTomato-CreER* a indiqué un modèle d'expression restreint similaire d'ID4 dans les spermatogonies A<sub>5</sub>. Cette étude de *lineage tracing* leur permettant de suivre les colonies marquées pendant plus de 1 an a démontré que les cellules *Id4*<sup>+</sup> génèrent de façon continue tous les stades des cellules germinales en condition homéostatique. Les cellules *Id4*<sup>+</sup> seraient donc, selon cette équipe, les cellules souches réelles, possédant un potentiel souche à long terme (Sun *et al.*, 2015).

De plus, des expériences de régénération de la spermatogénèse ont apporté de nouvelles informations quant au potentiel souche des CSG selon un gradient d'expression du gène *Id4* (Helsel *et al.*, 2017). Dans les testicules prépubères (P8), la population de spermatogonies exprimant fortement ID4 (ID4<sup>bright</sup>) possède le potentiel de régénération après transplantation contrairement à la population exprimant faiblement ID4 (ID4<sup>dim</sup>) (Figure 8). L'importance d'ID4 est aussi confirmée par la surexpression constitutive d'*Id4* dans les cellules germinales, qui inhibe l'expansion postnatale du pool de spermatogonies indifférenciées et la formation de progéniteurs engagés, ce qui entraîne une détérioration de la spermatogénèse à l'âge adulte chez les souris et les rend infertiles (Helsel *et al.*, 2017). Ces expériences suggèrent que le niveau d'expression d'*Id4* est corrélé positivement à la transition entre cellules souches et progéniteurs dans les spermatogonies. Néanmoins ce modèle présente des limites car la niche, l'identité et la régulation des CSGs des souris néonatales diffèrent de celles à l'âge adulte.

Récemment, le groupe de Hobbs a soulevé des doutes quant à la validité de ce modèle. Leur étude de single-cell RNA-sequencing a révélé une expression plus importante d'*Id4* au sein de la population indifférenciée que celle déterminée par Chan *et al.* (~30% des cellules

*Plzf*<sup>+</sup> sont *Id4*<sup>+</sup>, et 85% des cellules *GFRα1*<sup>+</sup> sont *Id4*<sup>+</sup>) (La, Chan, *et al.*, 2018; La, Mäkelä, *et al.*, 2018). De même, l'équipe de Yoshida retrouve ID4 largement exprimé dans toute la population indifférenciée *GFRα1*<sup>+</sup> et même dans la population de progéniteurs *NGN3*<sup>+</sup> (Kitadate *et al.*, 2019).

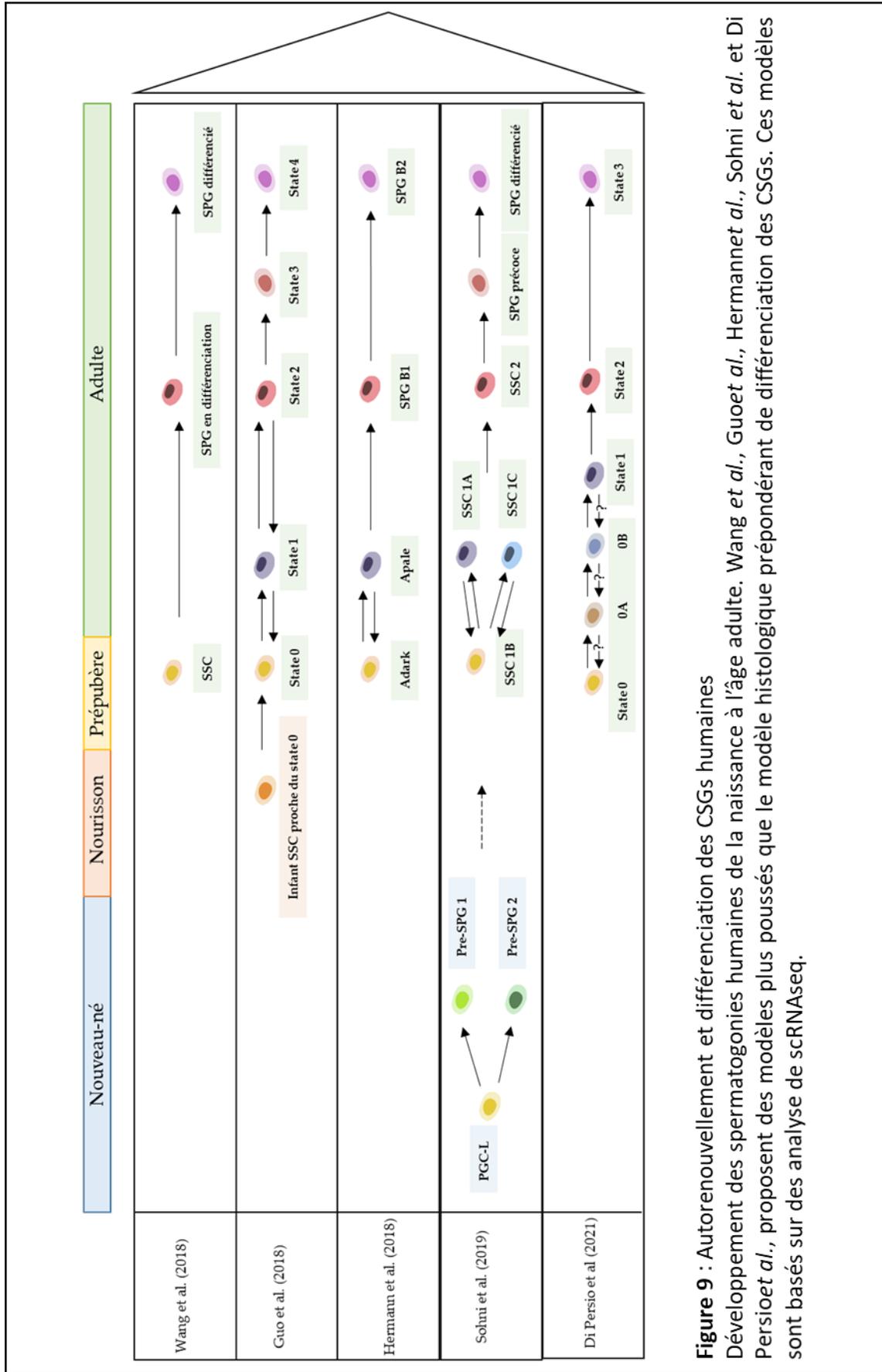
La question du modèle d'autorenouvellement et de différenciation des CSGs suscite de nombreux débats dans le milieu de la biologie de la reproduction, mais jusqu'à présent ni le modèle de fragmentation, ni le modèle hiérarchique ne définissent complètement les CSGs. Ces études ont cependant fourni des informations précieuses sur le fonctionnement et le comportement des CSGs tout au long du développement. Le modèle de fragmentation stochastique nous apporte des informations sur le maintien des CSGs par cytokinèse complète d'une partie de la chaîne de spermatogonies *A<sub>pr</sub>* ou *A<sub>al</sub>*. Le modèle hiérarchique nous apporte des informations sur les progéniteurs et leur contribution au pool de cellules souches. Bien que ces modèles soient très contrastés, ils confirment tous les deux que la fragmentation des chaînes et les activités d'autorenouvellement existent dans les spermatogonies *GFRα1*<sup>+</sup>, et qu'il existe une hiérarchie fonctionnelle dans les spermatogonies indifférenciées dépendante de l'environnement.

Une nouvelle étude de Yoshida tend à réconcilier ces deux modèles. Il propose qu'en condition homéostatique, il existe une hiérarchie au sein de la population hétérogène des spermatogonies indifférenciées *GFRα1* positives. Il distingue 3 états (X, Y, Z) en fonction de l'expression de deux marqueurs : PLVAP et SOX3. Ces trois états possèdent tous un potentiel souche, mais celui-ci suit un gradient de l'état X ayant le plus de potentiel souche et exprimant PLVAP, à l'état Z ayant le moins de potentiel souche et exprimant SOX3. Cependant la transition d'un état à un autre n'est pas linéaire, Y serait un état de transition, permettant soit à l'état X de se différencier en l'état Z, soit un retour à l'état initial de Z vers X (Nakagawa *et al.*, 2021).

## E) Modèle d'autorenouvellement et de différenciation de spermatogonies humaines

Le modèle d'autorenouvellement et de différenciation des CSGs humaines a été longtemps basé sur des analyses histologiques. Les spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  et  $A_{\text{pale}}$  sont considérées comme des cellules souches. Les spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  fonctionnent comme les cellules souches de réserve, tandis que les spermatogonies  $A_{\text{pale}}$  sont des cellules souches capables d'autorenouvellement et de différenciation (Clermont and Leblond, 1959; Clermont, 1966b). Les spermatogonies  $A_{\text{pale}}$  pourraient également contribuer à la régénération du pool de  $A_{\text{dark}}$ . Les spermatogonies  $A_{\text{pale}}$  mûrissent en spermatogonies de type B qui vont rentrer en méiose. Il n'y a qu'une seule génération de spermatogonies de type B avant la différenciation en spermatoocytes, ce qui rend la spermatogenèse humaine moins efficace que chez les rongeurs. Dans une étude sur les primates non humains, il a été postulé que la différence d'architecture nucléaire des spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  et  $A_{\text{pale}}$  pourrait être davantage corrélée aux stades du cycle cellulaire (G0 vs. G1/S/G2/M) qu'à des fonctions distinctes des cellules souches (Hermann *et al.*, 2010). Cependant, la distinction entre les deux populations de spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  et  $A_{\text{pale}}$  est remise en cause par différentes études, et notamment des analyses RNAseq, montrant une certaine redondance transcriptomique entre ces deux populations mais aussi une hétérogénéité au sein de chaque population (Di Persio *et al.*, 2017; Jan *et al.*, 2017; von Kopylow and Spiess, 2017).

Récemment, de nombreux travaux de scRNAseq ont permis une nouvelle compréhension de l'organisation complexe des spermatogonies chez l'Homme. Ces nouvelles analyses suggèrent un processus d'autorenouvellement et de différenciation plus complexe, en raison d'une plasticité et d'une hétérogénéité plus importantes des spermatogonies humaines. De multiples états spermatogoniaux chez l'homme adulte ont été identifiés sur la base de profils transcriptionnels (Guo *et al.*, 2018; Hermann *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019a; Di Persio *et al.*, 2021) et une hiérarchie dans le processus de différenciation entre ces populations a été déduite de ces transcriptomes. Dans son modèle, Guo parle de cinq stades cellulaires identifiés chez les spermatogonies, dont trois chez les indifférenciées, le « stade 0 » étant le plus primitif, donnant ensuite le « stade 1 » puis le « stade 2 » pour enfin s'engager dans la différenciation correspondant au « stade 3 » et au « stade 4 » (Figure 9).



**Figure 9** : Autorenouvellement et différenciation des CSGs humaines  
 Développement des spermatogonies humaines de la naissance à l'âge adulte. Wang *et al.*, Guoet *al.*, Hermannet *al.*, Sohni *et al.* et Di Persioet *al.*, proposent des modèles plus poussés que le modèle histologique prépondérant de différenciation des CSGs. Ces modèles sont basés sur des analyse de scRNAseq.

Les stades 1 et 2 sont capables d'avancer dans leur maturation ou bien de revenir au stade précédent (Guo *et al.*, 2018). De même Sohni fait état de trois stades différents nommés : SSC1-A, SSC1-B et SSC1-C (SSC : spermatogonial stem cell). Ici, le sous-ensemble SSC1-B est considéré comme le plus primitif, capable de donner soit des SSC1-A soit des SSC1-C. Ces derniers sont capables de revenir à l'état de SSC1B ou de partir vers la différenciation (Sohni *et al.*, 2019a). Cette capacité à réverter n'est pas sans rappeler le modèle murin de fragmentation. Enfin, Di Persio identifie six stades spermatogoniaux selon l'expression de différents marqueurs : état 0 (PIWIL4, PHDGH et EGR4), état 0A (UTF1, SERPINE2 et FGFR3), état 0B (NANOS2), état 1 (GFR $\alpha$ 1, GFRA2, NANOS3 et ID4), état 2 (KIT, MKI67, DMRT1 et DNMT1) et état 3 (STRA8 et SYCP3) (Di Persio *et al.*, 2021). Les états 0, 0A et 0B seraient corrélés à l'état 0 (Guo *et al.*, 2018), et aux états SSC1-B, SSC1-A et SSC1-C (Sohni *et al.*, 2019a). L'ontogénèse des CSGs déduite des différentes analyses transcriptomiques sur les testicules fœtales prépubères et adultes est résumée (Figure 9). Cependant, cette méthode a des limites. En effet le potentiel souche des différents états ne peut être testé tant qu'il ne sera pas possible de purifier ces cellules pour les transplanter.



## Chapitre 2 : DOT1L, la méthyltransférase de l'histone 3 lysine 79, et son rôle en tant que modulateur épigénétique

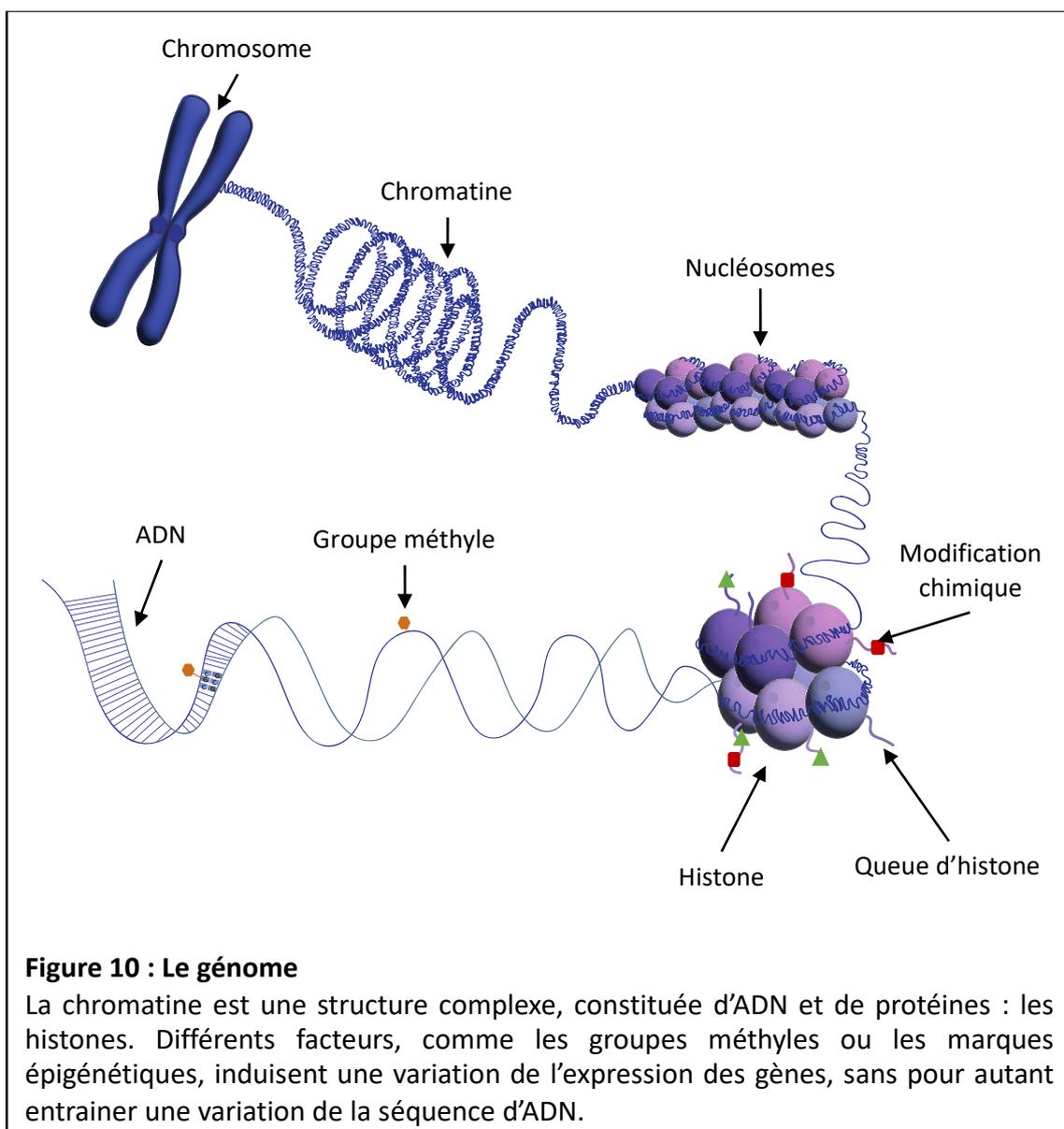
L'épigénétique se définit comme la science étudiant des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes lors des divisions cellulaires (par mitose et/ou méiose), qui n'impliquent pas de changement dans la séquence nucléotidique de l'ADN. En effet, il existe au moins deux formes d'informations dans le génome de la cellule :

- L'information génétique : elle fournit les éléments de base pour la fabrication de toutes les protéines nécessaires à l'activité fonctionnelle de la cellule.
- Les informations épigénétiques : elles constituent une « couche » d'informations supplémentaires et fournissent des instructions sur la manière, le moment et la région tissulaire où ces informations devront être utilisées.

Le code épigénétique permet aux cellules de recevoir et de se souvenir des signaux induits par l'environnement pour créer un état plus stable (Grewal and Klar, 1996; Cavalli and Paro, 1998). On distingue différents mécanismes moléculaires qualifiés d'épigénétiques. Parmi ceux-ci figurent la méthylation de l'ADN, l'activité des micro-ARNs, les modifications post-traductionnelle des histones (méthylation, acétylation, ubiquitination, phosphorylation) ou encore des modifications de la structure tridimensionnelle de la chromatine.

Le mécanisme épigénétique le plus connu et le plus étudié est la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN, l'ajout d'un groupe méthyle (-CH<sub>3</sub>) chez les eucaryotes, se retrouve principalement sur les cytosines en position 5 (5mC : C5 methylcytosine) (Figure 10). Dans les cellules de mammifères, le 5mC est assez fréquent ; il se produit principalement dans les dinucléotides CpG (Cytosine – phosphate- Guanine). Chez l'Homme, on retrouve entre 60 et 80% de paires de CpG méthylés (Ehrlich *et al.*, 1982). Il est intéressant de noter que les CpG restant non méthylés ne sont pas distribués au hasard dans le génome, mais se concentrent sur ce que l'on appelle des îlots CpG, qui coïncident pour la plupart avec les promoteurs de gènes. En effet, environ la moitié des transcrits des mammifères commence dans un îlot CpG (Bird, 2002). Une hyperméthylation de ces régions entraîne ainsi un arrêt de la transcription,

comme pour l'inactivation du chromosome X lors du développement (Jaenisch and Bird, 2003). En conséquence, la méthylation de l'ADN est une modification épigénétique cruciale du génome et participe à la régulation de nombreux processus cellulaires, notamment le développement embryonnaire, la structure de la chromatine, l'empreinte génomique et la stabilité des chromosomes. L'importance de cette marque épigénétique est telle, que la méthylation aberrante de l'ADN est associée à un nombre croissant de maladie humaine (Robertson, 2005).



Chez les eucaryotes, on retrouve trois types de petits ARNs régulateurs : les miARNs (*microRNA*), les piARNs (*PIWI-interacting RNA*) et les siARNs (*small interfering RNA*). Les petits ARNs sont formés de transcrit du génome cellulaire d'environ 20 à 30 nucléotides (Bartel, 2004). Les petits ARNs agissent conjointement avec les protéines effectrices de la famille Argonaute, au niveau des mécanismes de répression des gènes, soit par la répression de la traduction soit par le clivage de l'ARN messager. Pour cela, le complexe petit ARN/protéine Argonaute s'apparie aux régions UTR (région non traduite : untranslated regions) de l'ARNm (Grimson *et al.*, 2007). Les mécanismes d'action varient en fonction des organismes.

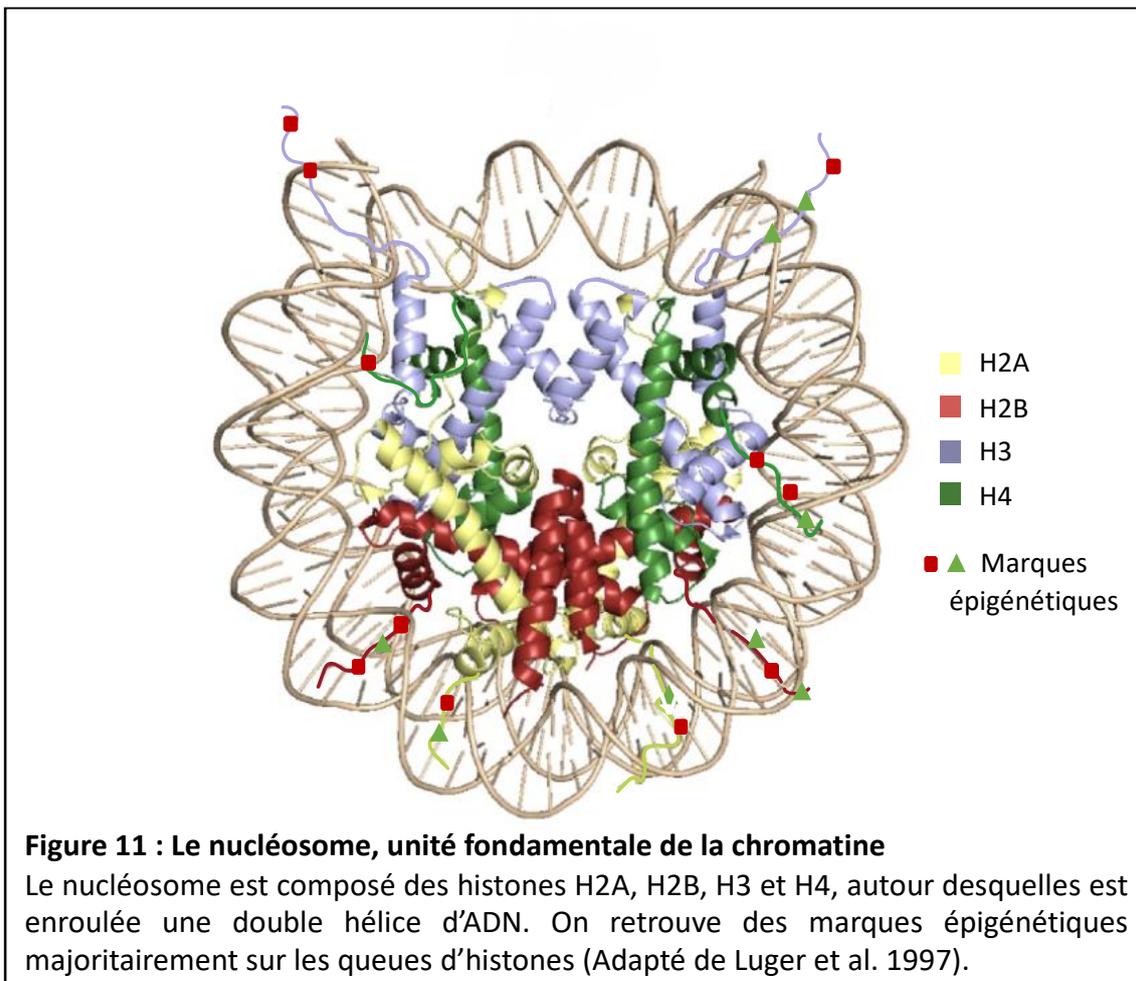
Enfin, la modification post-traductionnelle des histones soutenant le code épigénétique des histones est un mécanisme très important de régulation de l'expression des gènes (Figure 10). En lien avec mon travail de thèse sur le rôle de la méthyltransférase DOT1L de l'histone 3 lysine 79 dans les cellules souches germinales, c'est cet aspect des mécanismes épigénétiques qui sera développé dans cette introduction.

## 1) Histones et code épigénétique des histones

### A) Structure des histones

L'information génétique dans le noyau des cellules eucaryotes, le génome, est organisée dans un complexe nucléoprotéique (ADN-histone) hautement conservé : la chromatine, qui soutient et contrôle les fonctions importantes du génome, comme l'encapsulation de l'ADN pour permettre la mitose et la méiose, le contrôle de l'expression des gènes ainsi que la réplication de l'ADN. La chromatine est organisée en compartiment ouvert (l'euchromatine) et en compartiment condensé (l'hétérochromatine). En 1928, Emile Heitz fut le premier à décrire certaines parties des chromosomes mitotiques comme plus denses définissant ainsi l'hétérochromatine et l'euchromatine respectivement (Heitz, 1928). On affirme généralement que la structure plus condensée rend difficile l'interaction des facteurs de régulation avec leur cible ADN. Par conséquent la compaction de l'euchromatine est plus propice à la transcription active que l'hétérochromatine. L'hétérochromatine est principalement constituée de séquences d'ADN répétitives telles que l'ADN-satellite péri-centromérique hautement répétitif, tandis que les gènes actifs sur le plan transcriptionnel

sont situés dans l'euchromatine. Par conséquent, la transition entre ces deux niveaux d'organisation est importante notamment pour le contrôle de la transcription et de la réplication (Morales *et al.*, 2001; Vaquero *et al.*, 2004; Kouzarides, 2007). Les changements affectant la structure de la chromatine ont un impact profond sur l'expression des gènes et l'organisation du génome.



L'unité de base de la structure de la chromatine est le nucléosome (Figure 11). Il est formé d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule 1,7 fois 145 à 147 paires de base d'ADN. Cet octamère d'histone est composé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 s'associant en deux dimères H2A-H2B et H3-H4 (Noll et Kornberg 1977; Kouzarides 2007). Chez l'Homme, on retrouve, dans un noyau de 10µm de diamètre, environ 2 mètres d'ADN empaqueté.

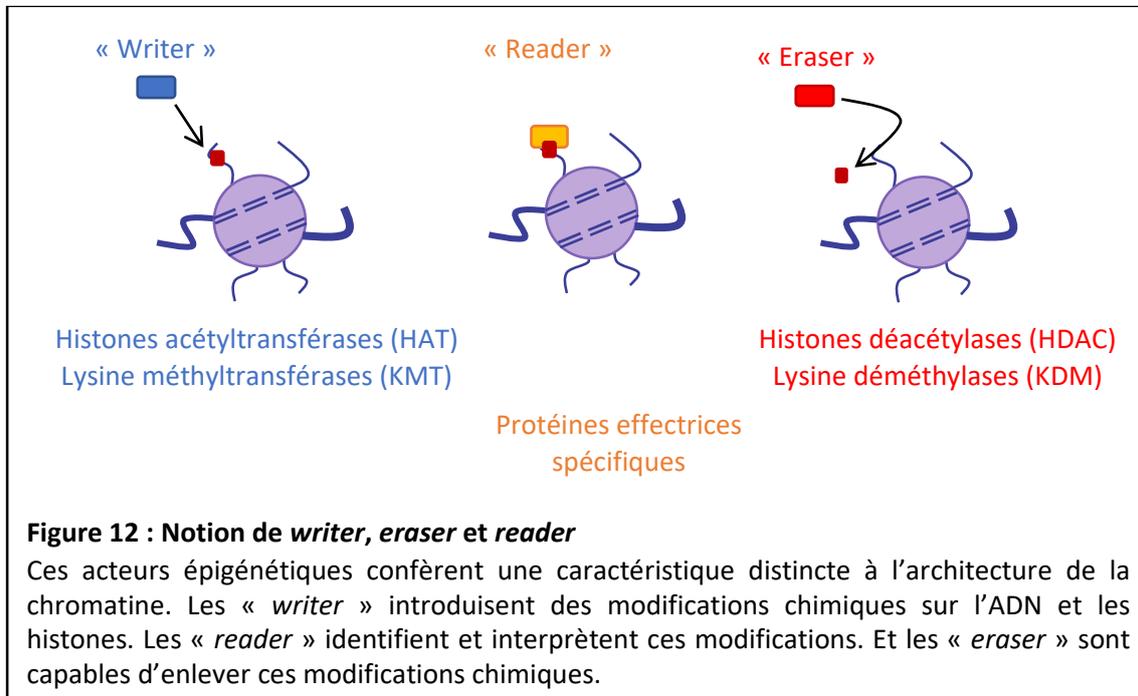
Le nucléosome est stabilisé par une multitude d'interactions protéine-protéine au sein de l'octamère d'histone et par de nombreuses liaisons ioniques entre les histones et l'ADN sur toute sa longueur (Arents and Moudrianakis, 1993). La majorité des interactions se font entre les régions structurées des histones (majoritairement globulaires) et l'ADN, tandis que leurs parties N-terminales et C-terminales, non structurées, permettent leur accessibilité à des facteurs nucléaires (Noll and Kornberg, 1977). Ces extrémités peuvent subir des modifications post-traductionnelles (MPT), comme des altérations chimiques : méthylation ou acétylation par exemple, provoquant une modification d'affinité avec le nucléosome. Ils sont donc porteurs de marques épigénétiques.

### B) Le « code épigénétique » des histones

Les diverses modifications post-traductionnelles des histones sont la base du code épigénétique des histones (Jenuwein and Allis, 2001). La lecture de ce code par les protéines régulatrices entraîne des variations de l'état chromatinien : actif, permissif, inactif ou restrictif. Les MPT constituent un mécanisme épigénétique majeur pour le contrôle de l'expression des gènes. Les marques d'histone ont été détectées sur divers résidus, situés soit de façon plus rare dans la région globulaire serrée de l'histone ou dans la partie C-ter, soit principalement le long de la queue N-ter (plus accessibles aux enzymes de modification des histones), où elles peuvent affecter la condensation, l'emballage ou la liaison des protéines à la chromatine, ce qui régule de manière complexe les processus allant de l'expression des gènes à la stabilité génomique (Bannister and Kouzarides, 2011).

Ces modifications covalentes comprennent l'acétylation des résidus de lysine, la méthylation des résidus d'arginine (mono- ou di-) et de lysine (mono-, di- ou tri-), la phosphorylation des résidus de sérine, de thréonine et de tyrosine, l'ubiquitination, la SUMOylation, et d'autres MPTs encore peu caractérisées telles que la crotonylation, la formylation et la propionylation/butyrylation de la lysine, l'ADP-ribosylation, la déimination, la citrullination (Bannister and Kouzarides, 2011; Sidoli, Cheng and Jensen, 2012). Ces modifications sont réalisées par des enzymes spécifiques : on distingue les « *writer* » qui apposent les marques, les « *eraser* » qui effacent les marques et les « *reader* » qui

reconnaissent les marques (Figure 12). Les principales modifications d'histones sont répertoriées dans le tableau 2.



### 1) [L'acétylation des histones](#)

Les processus d'acétylation et de désacétylation des histones sont catalysés par les histones acétyltransférases (HATs) et les histones désacétylases (HDACs), respectivement. L'acétylation est généralement associée à une transcription active (Kuo and Allis, 1998). En effet, les HAT confèrent des charges négatives effectives aux histones, entraînant une répulsion avec l'ADN elle-même chargée également négativement. Cela aide au déroulement de la chromatine et permet l'accessibilité des facteurs de transcription. De même, la désacétylation des histones par les HDAC, entraîne un resserrement de la chromatine autour des régions régulatrices, entraînant ainsi la répression de la transcription (Wang *et al.*, 2009).

Modification d'histone	Writer	Reader	Eraser
H2BK120 ubiquitination	RNF20	—	USP7
	RNF40		USP22
	BRCA1		USP44
H3K4 Méthylation	SET1A/KMT2E	CHD1	LSD1/KDM1A
	SET1B/KMT2F	BPTF	LSD2/KDM1B
	MLL1/KMT2A	TAF3	NO66/MAPJD
	MLL2/KMT2B	Sgf29	JARID1A/KDM5A
	MLL3/KMT2C	ING4	JARID1B/KDM5B
	MLL4/KMT2D	CFP1	JARID1C/KDM5C
	SMYD1/KMT3D	PHF2/KDM7C	JARID1D/KDM5D
	SMYD2/KMT3C	SPIN1	
	SET7/9/KMT7	PHF23	
	PRDM9/KMT8B	PYGO2	
H3K9 Méthylation	SUV39H/KMT1A–B	HP1 $\alpha/\beta$	JHDM2A/KDM3A
	G9a/KMT1C	HP1 $\gamma$	JHDM2B/KDM3B
	GLP/KMT1D	UHRF1	JHDM2C/KDM3C
	SETDB1/KMT1E		JHDM3A/KDM4A
	PRDM family		JHDM3B/KDM4B
			JHDM3C/KDM4C
			JHDM3D/KDM4D
			PHF8/KDM7B
		PHF2/KDM7C	
H3K9 Acétylation	GCN5L2/KAT2A	BRD4	SIRT6
	PCAF/KAT2B	BRD7	SIRT2
	CBP/KAT3A	BRDT	SIRT1
	p300/KAT3B	CERF	
	MOZ/KAT6A	CBP	
	ELP3	GCN5	
		BAF180/PBRM1	
		PCAF	
		BRM/SMARCA2	
		BRG1/SMARCA4	
		TAF1	
		MORF	
		MOZ	
	AF9		
	ENL		
	GAS41		
H3K27 Méthylation	EZH1/KMT6B	CBX7	UTX/KDM6A
	EZH2/KMT6A	EED	UTY/KDM6C
		BAHD1	JMJ3/KDM6B
		NSD2	KIAA1718/KDM7A
			PHF8/KDM7B
H3K27 Acétylation	CBP/KAT3A	AF9	
	p300/KAT3B	ENL	
		GAS41	
H3K36 Méthylation	SETD2/KMT3A	DNMT3A	JHDM1A/KDM2A
	NSD1/KMT3B	LEDGF	JHDM1B/KDM2B
	NSD2/KMT3G	NBS1	JHDM3A/KDM4A
	NSD3/KMT3F	Ku70	JHDM3B/KDM4B
	SMYD2/KMT3C	MRG15	JHDM3C/KDM4C
	ASH1L/KMT2H	ZMYND11	JHDM3D/KDM4D
	SETD3		
	SETMAR		
H3K79 Méthylation	DOT1L/KMT4	—	—
H4K16 acétylation	CBP/KAT3A	BRD2	SIRT1
	p300/KAT3B	BRD4	SIRT2
	Tip60/KAT5	BRD7	SIRT6
	MYST1/KAT8	BRDT	
		TAF1	
	NuRD		
H4K20 Méthylation	SET8/KMT5A	TP53BP1	PHF8/KDM7B
	SUV4-20H1/KMT5B	L3MBTL1	PHF2/KDM7C
	SUV4-20H2/KMT5C	ORC1	LSD1n
		ORCA	
	Pdp1		

**Tableau 2** : Liste des principales modifications d'histones et des enzymes responsables de ces modifications.

## 2) [La méthylation des histones](#)

La méthylation des histones est régulée par les histones méthyltransférases (HMTs, *writers*) et les histones déméthylases (HDMs, *eraser*). En outre, des protéines effectrices distinctes ("*readers*") reconnaissent des méthyl-lysines spécifiques en fonction de la séquence d'acides aminés voisine et de l'état de méthylation. La méthylation des histones est associée à l'activation et à la répression de l'expression des gènes, en fonction des résidus spécifiques qui sont méthylés et du nombre de groupes méthyles qui sont ajoutés à ces résidus. Les HMTs catalysent le transfert d'un groupe méthyle d'une S-adénosylméthionine (SAM) au groupe  $\epsilon$ -amino d'une lysine ou groupe  $\omega$ -guanidino d'une arginine.

Dans le cas d'une lysine, on parle d'histone lysine méthyltransférase (HKMTs) (Greer and Shi, 2012). De nombreuses HKMTs ont été identifiées, elles sont relativement spécifiques d'une méthylation, et la grande majorité d'entre elles méthylent les lysines dans les queues N-terminales. L'activité enzymatique des HKMTs réside au niveau du SET domaine (**Su**(var)3-9, **Enhancer-of-zeste** and **Trithorax**). Toutefois, l'enzyme Dot1, qui méthyle H3K79 dans le noyau globulaire de l'histone, ne contient pas de domaine SET et constitue une exception (Cheng, Collins and Zhang, 2005). Les marques de méthylation H3K4, H3K36 et H3K79 sur les lysines de l'histone H3 sont souvent associées à une transcription active et les marques de méthylation sur les lysines H3K27, H3K9 et H4K20 des histones H3 et H4 sont souvent associées à une répression de la transcription (Hyun *et al.*, 2017).

Dans le cas de l'arginine, les arginines méthyltransférases font partie de la famille des PRMTs, dont il existe deux classes différentes. Les marques de méthylation sur les arginines H4R3me2a, H3R2me2s, H3R17me2a et H3R26me2a sont souvent associées à une transcription active et les marques de méthylation sur les arginines H3R2me2a, H3R8me2a, H3R8me2s et H4R3me2s des histones sont souvent associées à une répression de la transcription (Blanc and Richard, 2017).

Ces méthylations sont réversibles par des enzymes : les déméthylases. Il existe deux types de lysine déméthylase (KDMs) : les amine-oxydases<sup>11</sup> et les dioxygénases ferro-dépendantes contenant le domaine jumonji C. Il existe un équilibre entre la méthylation et la

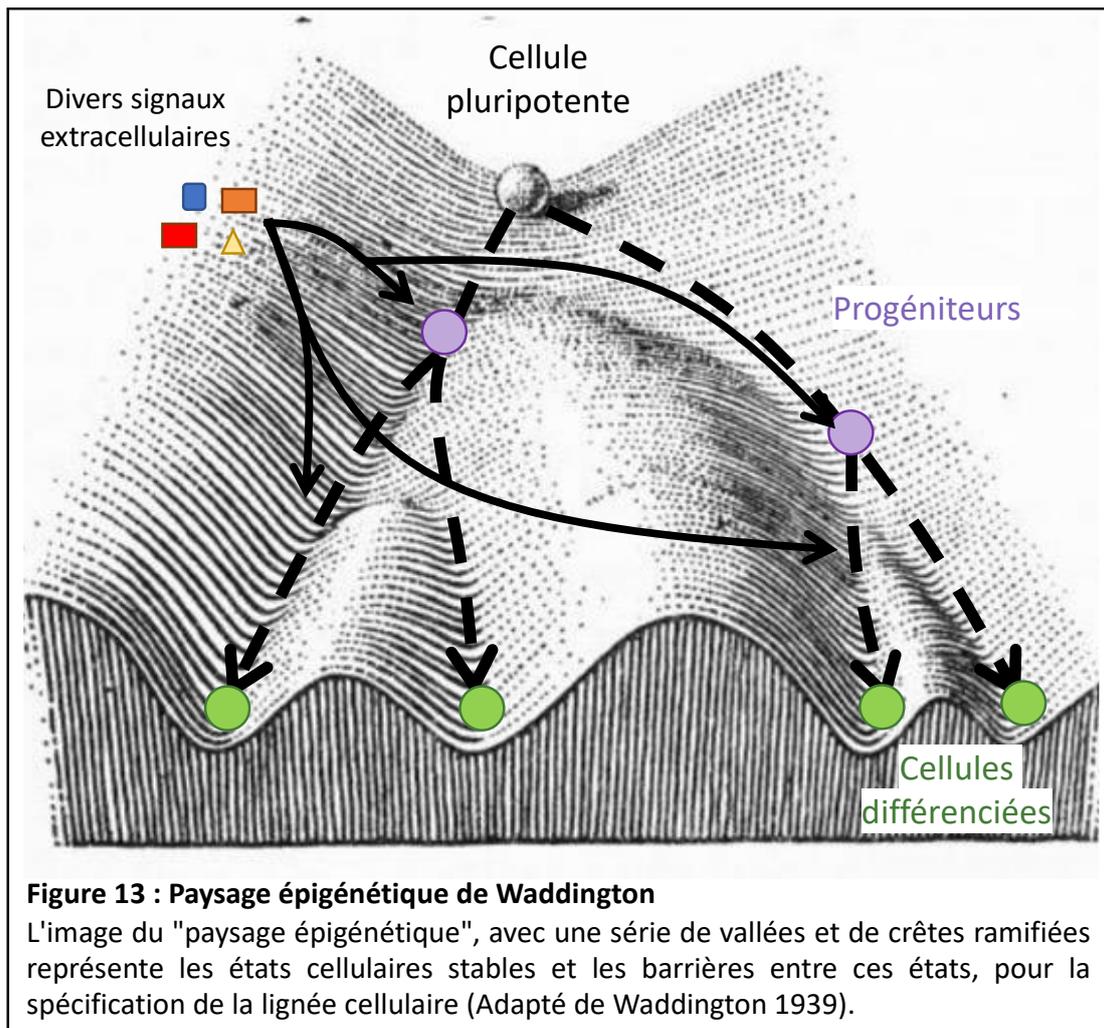
déméthylation qui aide à la régulation de l'expression des gènes dans la cellule, et le maintien de la dynamique de la chromatine (Greer and Shi, 2012).

## II) Épigénétique et cellule souche : régulation de l'homéostasie et différenciation

Les mécanismes épigénétiques, notamment par l'étroite régulation de l'expression des gènes, jouent un rôle central dans le destin cellulaire des cellules souches. Ces mécanismes sont essentiels pour déterminer l'expression des gènes pendant la différenciation cellulaire et régir le développement des mammifères. En effet la méthylation de l'ADN et les modifications des histones sont des facteurs cruciaux dans la programmation des cellules souches vers des lignées spécifiques de différenciation cellulaire et tissulaire. Dans un premier temps, j'exposerai les principes et les mécanismes épigénétiques mis en jeu en prenant principalement comme exemple les cellules souches pluripotentes, étant le modèle le mieux décrit dans la littérature. J'aborderai ensuite les études portant sur les mécanismes épigénétiques dans les cellules souches et les progéniteurs spermatogoniaux.

### A) Paysage épigénétique

Au début des années 1930, Conrad Hal Waddington propose l'idée de l'existence d'un paysage épigénétique (« *epigenetic landscape* ») (Figure 13) (Waddington, 1939). Ce paysage est une surface inclinée avec de nombreuses crêtes et vallées ramifiées qui, dans le contexte de la sélection de la lignée cellulaire, représentent une série de choix et de possibilités, prise par une cellule au cours du développement (figure 13). La surface du paysage représente les gènes qui ont subi des modifications épigénétiques. L'environnement de la cellule via des signaux extracellulaires exerce une influence sur l'expression génique qui se propage après la division cellulaire. Dans l'embryon par exemple, le chemin choisi par la cellule pluripotente le long des crêtes de différenciation dépend de la conformation de la surface, qui représente les modifications épigénétiques. Ces modifications sont liées à des processus moléculaires qui régulent l'architecture de la chromatine, notamment les interactions entre les histones, les facteurs de transcription et l'ADN. Ces modifications déterminent le destin de la cellule.



## B) Régulation des marques épigénétiques des histones dans les cellules souches

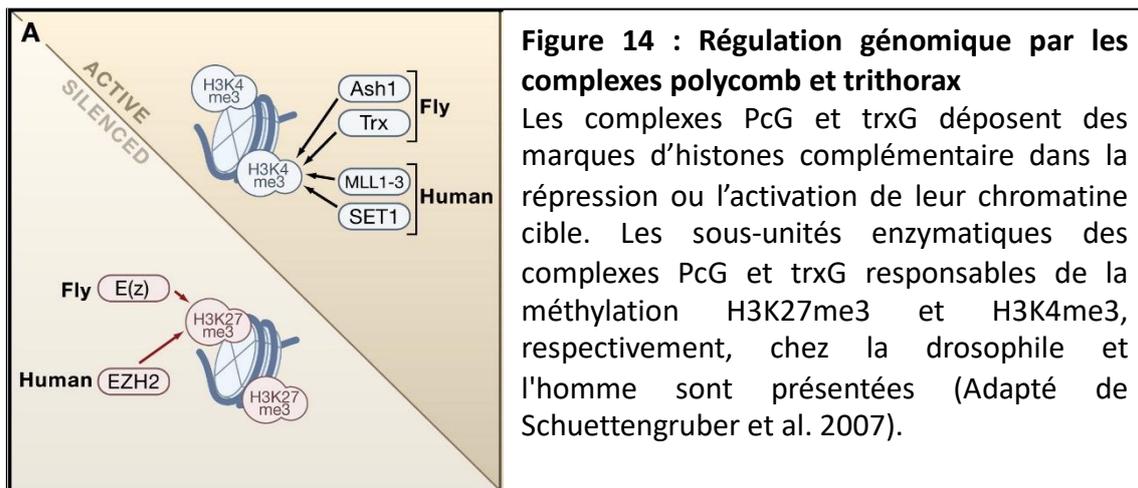
L'organisation chromatinienne joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence et la différenciation des cellules ES par exemple. La compaction de la chromatine est conditionnée et régulée par différents complexes protéiques qui jouent aussi un rôle important dans la régulation des marques épigénétiques des histones et le maintien des cellules souches.

### 1) Les complexes polycomb et trithorax

Les groupes de protéines Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) sont des régulateurs épigénétiques, impliqués dans les mécanismes de maintien de l'état réprimé ou actif respectivement de l'expression génique. Initialement découverts chez la drosophile, les PcG et TrxG y ont pour cibles les gènes de la famille *Hox*, et agissent de manière antagoniste pour

maintenir les états de transcription de ces gènes, permettant ainsi un développement correct chez la Drosophile (Jürgens, 1985; Papp and Müller, 2006). Par la suite, il a été démontré que les complexes PcG et TrxG régulent de nombreux autres processus cellulaires comme l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique, le contrôle du cycle cellulaire, et sont notamment impliqués dans le maintien des équilibres homéostatiques et régénératifs dans le tissu adulte par la modulation de l'expression génétique dans les cellules souches. Ainsi il existe une importante diversité fonctionnelle permise par la variété de complexes PcG et TrxG présents dans les cellules dès le développement, permettant au niveau des gènes cibles de remodeler l'état chromatinien via la modification des histones.

Le complexe PcG joue donc un rôle important dans l'extinction des régulateurs du développement. En effet, ces protéines forment deux complexes répressifs polycomb (PRC) le PRC1 et le PRC2 (Boyer *et al.*, 2006). En revanche les complexes de la famille TrxG jouent un rôle dans les mécanismes d'activation de l'expression des gènes. On retrouve notamment les complexes *Tac1* (*Trithorax Acetylation Complex 1*), *Ash1* (*Absent, small and homeotic discs*) et MLL1-3 (*mixed-lineage leukemia*), qui sont associés à des activités de méthylation et d'acétylation des histones. Ces deux familles agissent donc de manière antagoniste, notamment dans les modifications qu'elles apportent aux histones. En effet les méthylations de H3K36 et de H3K4 sont catalysées respectivement par *Ash1* et *Trx* chez la drosophile (*Trx* est compris dans le complexe TAC1) et par MLL1-3 et SET1 chez l'humain. Ces marques épigénétiques inhibent la tri-méthylation médiée par PRC2 de H3K27, ou encore l'acétylation de H3K27, qui est régulée en amont par *Trx* et empêche la méthylation de ce même résidu, car les deux modifications ne peuvent coexister (Cao *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2011; Tie *et al.*, 2014) (Figure 14). Les complexes PcG et TrxG possèdent une fonction importante dans les cellules souches. Les protéines du complexe PcG sont nécessaires à la régulation des décisions relatives à l'état cellulaire, c'est-à-dire la quiescence, l'autorenouvellement et la différenciation. Pour éviter la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en quiescence, les protéines du PcG maintiennent l'état réprimé des inhibiteurs du cycle cellulaire. Pour empêcher la différenciation et maintenir l'autorenouvellement, elles maintiennent la répression des gènes régulés par le développement.

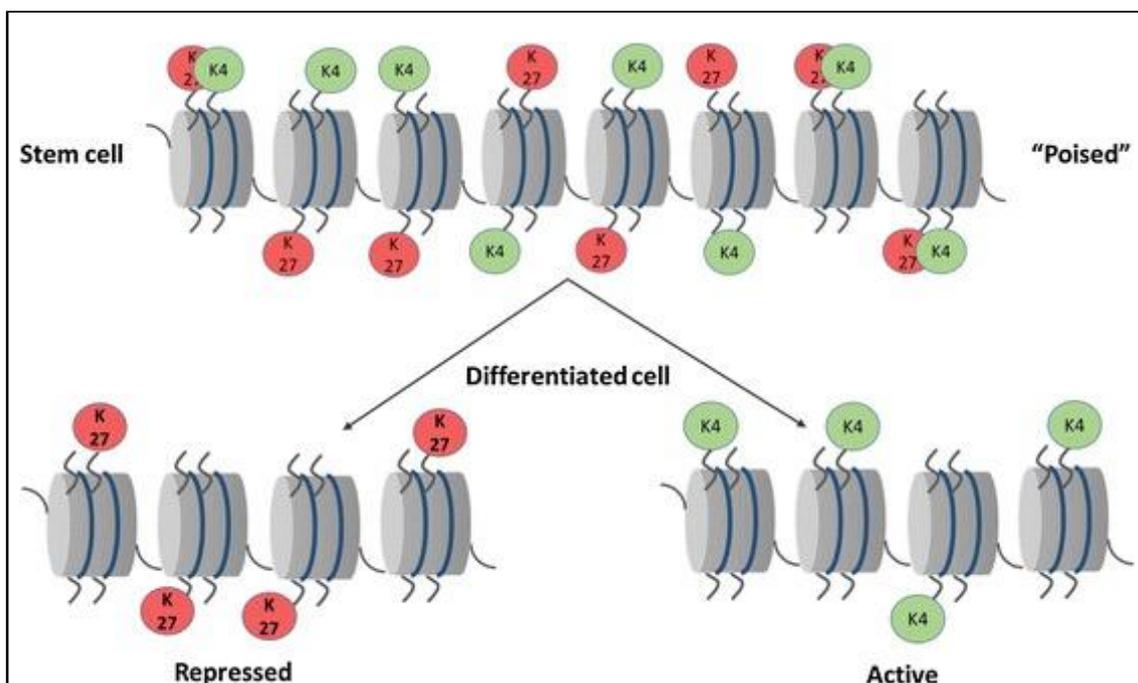


Et enfin pour permettre la différenciation vers une voie spécifique, elles inhibent les gènes exprimés dans les autres voies de différenciation possible (Park *et al.*, 2003; Shan *et al.*, 2017, p. 2; Chagraoui *et al.*, 2018). Le complexe TrxG est impliqué, tout d'abord dans le maintien des gènes de la pluripotence dans un état actif permettant la préservation dans les cellules souches de la « mémoire épigénétique ». Les protéines TrxG sont également nécessaires à l'activation des gènes spécifiques à la lignée vers laquelle va se différencier la cellule souche (Gao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016). Les protéines du complexe PcG sont connues pour jouer un rôle dans la prolifération des cellules souches somatiques et des progéniteurs, notamment les cellules de la peau (Ezhkova *et al.*, 2009) ou encore des muscles squelettiques (Juan *et al.*, 2011). Dans la lignée germinale, il a été démontré que la perte de PRC2 entraîne une déficience dans le maintien des spermatogonies indifférenciées, notamment au niveau de l'autorenouvellement (Mu *et al.*, 2014). De plus, il a été démontré que la perte de EZH2, une protéine du complexe PCR2, entraîne une perte de l'autorenouvellement et entraîne les progéniteurs vers la différenciation (Jin *et al.*, 2017). De même, la perte de PRC1 entraîne un problème d'autorenouvellement et de différenciation dans les spermatogonies indifférenciées (Maezawa *et al.*, 2017).

## 2) [Modifications des histones et notion de gènes bivalents dans les cellules souches](#)

La dynamique d'expression des gènes dans les cellules souches embryonnaires est minutieusement contrôlée par des modifications chimiques des histones, pour permettre la

pluripotence, l'autorenouvellement et en temps voulu la différenciation vers la voie choisie. Notamment l'interaction entre le facteur de transcription OCT4 et l'acétylation de l'histone H3K56, au niveau des promoteurs géniques, est importante pour le maintien de l'expression des gènes cibles, favorisant la pluripotence lors de l'autorenouvellement (Tan *et al.*, 2013). En revanche, la déacétylation de H3K56, médiée par la SIRT6, réprime l'expression de SOX2, NANOG et OCT4 (Etchegaray and Mostoslavsky, 2015). De plus, il existe dans les cellules ES, des domaines bivalents où deux marques antagonistes déposées par les complexes TrxG et PcG, actives (H3K4me) et répressives (H3K27me3), sont présentes sur une même région de la chromatine (Azuara *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2006). Ces promoteurs bivalents marquent des gènes faiblement exprimés et sont considérés en mode « veille » (« *poised* »), permettant leur activation rapide en réponse à la signalisation du développement lors de la différenciation (Voigt, Tee and Reinberg, 2013) (Figure 15).



**Figure 15 : Marques bivalentes de la chromatine**

La marque de méthylation répressive H3K27 et la marque de méthylation activatrice H3K4 sont toutes les deux présentes sur le génome de la cellule souche. Ces marques permettent la mise en veille « *poised* » de gènes qui sont rapidement activés ou réprimés lors de la différenciation (Adapté de Jog *et al.* 2017).

Ces marques bivalentes ne sont pas spécifiques aux cellules ES, en effet on les retrouve aussi dans d'autres cellules souches comme les iPS et les cellules souches hématopoïétiques (Cui *et*

*al.*, 2009; Harikumar and Meshorer, 2015). Les marques bivalentes sont donc très importantes dans les cellules souches et permettent de réguler finement la balance entre l'autorenouvellement et la différenciation.

### C) Les différents types de modifications d'histones observés dans les cellules souches germinales

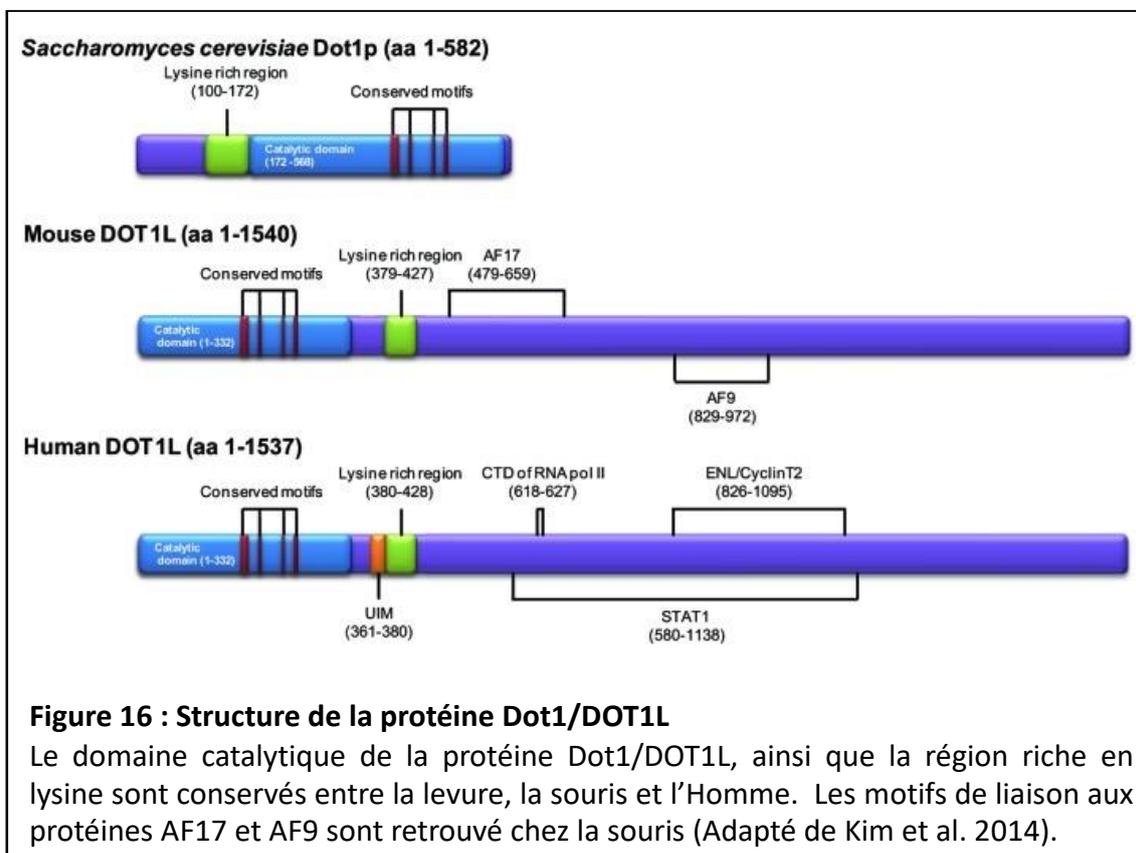
Pareillement aux autres cellules souches, les modifications d'histones dans les CSGs jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie, l'autorenouvellement et la différenciation. Dans les CSGs et spermatogonies indifférenciées murines, de nombreuses méthylations d'histones ont été identifiées, telles que H3K4me1-2-3 qui est une marque activatrice, H3K9me1-3, H3K27me2-3 et H4K20me2-3 qui sont des marques répressives (Godmann *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2015; Maezawa *et al.*, 2018), mais aussi l'acétylation d'histones avec H3K27ac. On retrouve également dans les CSGs la présence de domaines bivalents présentant les deux marques antagonistes : H3K27me3 et H3K4me3. Dans les CSGs, les promoteurs bivalents sont fortement présents au niveau des gènes codants pour la signalisation cellulaire, le développement, l'adhésion cellulaire et la morphogénie embryonnaire. Comme pour les cellules ES, les marques bivalentes chez les CSGs permettent une activation transcriptionnelle rapide lors de la différenciation (Tomizawa *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2021). En effet, lors de la différenciation, le choix du destin de la cellule implique une série ordonnée de changements dans la programmation épigénétique pour d'abord initier et ensuite stabiliser l'expression des gènes. Ainsi, l'enrichissement différentiel des marques histones notamment H3K27me3 et H3K27ac permet la distinction entre les CSGs et les progéniteurs (Cheng *et al.*, 2020). En effet la marque H3K27me3 est associée à la régulation négative des gènes différentiellement exprimés dans les spermatogonies, alors que la marque H3K27ac est associée à une régulation positive. Les profils de la marque H3K4me1-2-3, l'accessibilité de la chromatine et la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs et des *enhancers*, ne semblent pas influencer la régulation génique dans les spermatogonies, ainsi que l'accessibilité de la chromatine au niveau des *enhancers* (Cheng *et al.*, 2020). Des résultats similaires sur la méthylation de l'ADN et l'accessibilité à la chromatine ont été retrouvés dans les spermatogonies humaines indifférenciées et différenciées (Guo *et al.*, 2017, 2020).

### III) DOT1L et apposition de la marque H3K79 : cross talk avec les autres histones

#### A) La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 79 et DOT1L

DOT1L (*Disruptor of telomeric silencing like*), aussi connue sous le nom de KMT4, est une méthyltransférase, homologue de Dot1 découvert dans les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Singer *et al.*, 1998). Dot1 est retrouvé dans de nombreux autres organismes comme la drosophile mais aussi chez les protozoaires et les mammifères (Janzen *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008; List *et al.*, 2009). DOT1L et ses homologues sont impliqués dans de nombreux processus, notamment la régulation transcriptionnelle, la progression du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, mais aussi dans plusieurs types de cancers comme les leucémies (Okuda *et al.*, 2017).

La structure de la protéine DOT1L est bien définie et on retrouve des motifs relativement conservés de la levure, à la souris et à l'Homme, notamment le domaine catalytique (figure 16).



**Figure 16 : Structure de la protéine Dot1/DOT1L**

Le domaine catalytique de la protéine Dot1/DOT1L, ainsi que la région riche en lysine sont conservés entre la levure, la souris et l'Homme. Les motifs de liaison aux protéines AF17 et AF9 sont retrouvés chez la souris (Adapté de Kim *et al.* 2014).

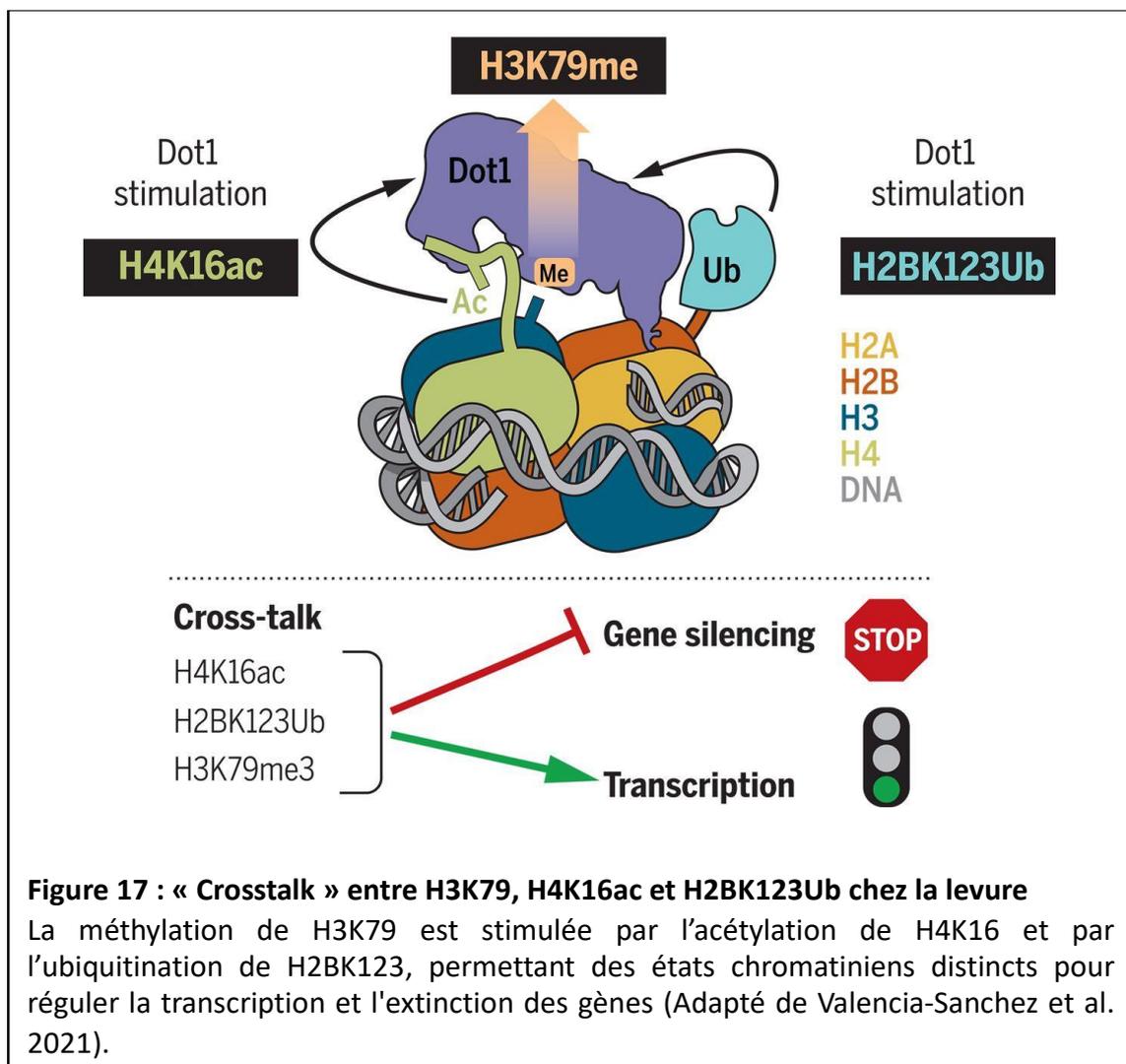
DOT1L chez la souris, possède 1540 acides aminés (aa), contenant un domaine histone méthyletransférase en N-ter (aa 1-332, un domaine catalytique non-SET). On trouve ensuite une région enrichie en lysine qui permet une interaction avec l'ADN. Pour finir, DOT1L possède une longue région C-ter pouvant médier l'interaction avec des partenaires de fusion des translocations retrouvées dans les leucémies, tels que AF9, AF10 ou encore ENL (Okuda *et al.*, 2017).

Les méthyltransférases transfèrent un groupe méthyle SAM, sur une lysine dans le cas de DOT1L. Il existe trois familles d'enzyme qui catalysent la méthylation des histones : la famille des PRMT (protein arginine N-methyltransferase), la famille des enzymes possédant un domaine SET et la famille ne possédant pas de domaine SET (Greer and Shi, 2012). DOT1L fait partie de cette dernière famille, celle-ci ne possédant pas de domaine SET (Anh Tram Nguyen *et al.*, 2011). L'activité méthyltransférase de Dot1 a pour la première fois été observée dans le modèle de la levure en 2001 (Dlakic, 2001). DOT1L est la seule méthyltransférase responsable de la mono-, di-, et tri- méthylation de H3K79. Cette méthylation est considérée comme une marque activatrice de la transcription (Nguyen and Zhang, 2011).

Le questionnement demeure sur l'existence d'une déméthylase de la marque H3K79. Cependant, la méthylation de H3K79 est réversible. En effet, chez la levure et l'humain, le niveau de H3K79me2 fluctue durant le cycle cellulaire (Feng *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2009), de même une perte soudaine de la marque a été observée lors du développement chez la drosophile et la souris (Shanower *et al.*, 2005; Ooga *et al.*, 2008). De plus, il est proposé en 2018 un modèle *in vitro* dans lequel la déméthylase KDM2B serait capable de déméthylater H3K79 (Kang *et al.*, 2018). KDM2B fait partie de la famille des protéines possédant un domaine Jumonji C (JmjC), elle est notamment connue pour la déméthylation de H3K36me2 et H3K4me3.

Contrairement à la majorité des résidus de l'histone H3 qui se trouve au niveau de la queue N-ter, la lysine K79 se situe dans une boucle du domaine globulaire et elle est méthylée lorsque l'histone H3 est incorporée dans la chromatine (Lacoste *et al.*, 2002). Ainsi, la méthylation de H3K79 est influencée par d'autres modifications épigénétiques, telles que l'ubiquitination de H2BK120 (H2BK120ub) chez l'Homme et K123 chez la levure (Luger *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2002; Shahbazian, Zhang and Grunstein, 2005). H2BK120ub est un marqueur

épigénétique de l'activation transcriptionnelle, de l'élongation par l'ARN polymérase II et du *silencing* des télomères. Des analyses structurales du nucléosome ubiquitiné suggèrent que l'interaction entre H2B ubiquitiné (H2Bub) et DOT1L pourrait stabiliser la liaison de DOT1L aux nucléosomes (Anderson *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2019). Ici, les modifications d'histones agissent de manière combinée sur le remodelage chromatinien, facilitant ainsi la transcription : on parle alors de *cross-talk*. H3K79me<sub>2-3</sub> interagit aussi avec d'autres marques épigénétiques comme H4K16ac. En effet, chez la levure, la désacétylation de H4K16 par le complexe SIR entraîne le *silencing* des télomères. Sir3 et Dot1 sont en compétition pour la liaison au patch basique court de l'histone H4. H4K16ac perturbe la liaison de Sir3 à la queue H4 et stimule au contraire la méthylation H3K79 dépendante de Dot1 (Altaf *et al.*, 2007; Fingerman, Li and Briggs, 2007). Récemment, Valencia-Sánchez et al, ont émis l'hypothèse qu'il existe une communication trans-histone croisée, permettant une boucle de rétroaction positive : H2Bub



régule la méthylation de H3K79 par Dot1, elle-même catalyse l'ubiquitination de H2B, et l'acétylation de H4K16 permet de stimuler la méthylation de H3K79 (Figure 17) (Valencia-Sánchez *et al.*, 2021).

Un autre exemple est l'interaction entre H3K9ac et H3K79me<sub>2-3</sub>. En effet AF9 et ENL, deux sous unités du Super Elongation complexe (SEC), reconnaissent par leur domaine YEATS (nommé pour ses cinq premières protéines contenant ce domaine Yaf9, ENL, AF9, Taf14 et Sas5) l'acétylation de H3K9 et permettent par leur interaction avec DOT1L, le recrutement à la chromatine de ce dernier et ainsi la méthylation de H3K79 (Li *et al.*, 2014).

## B) Rôle de DOT1L dans le développement

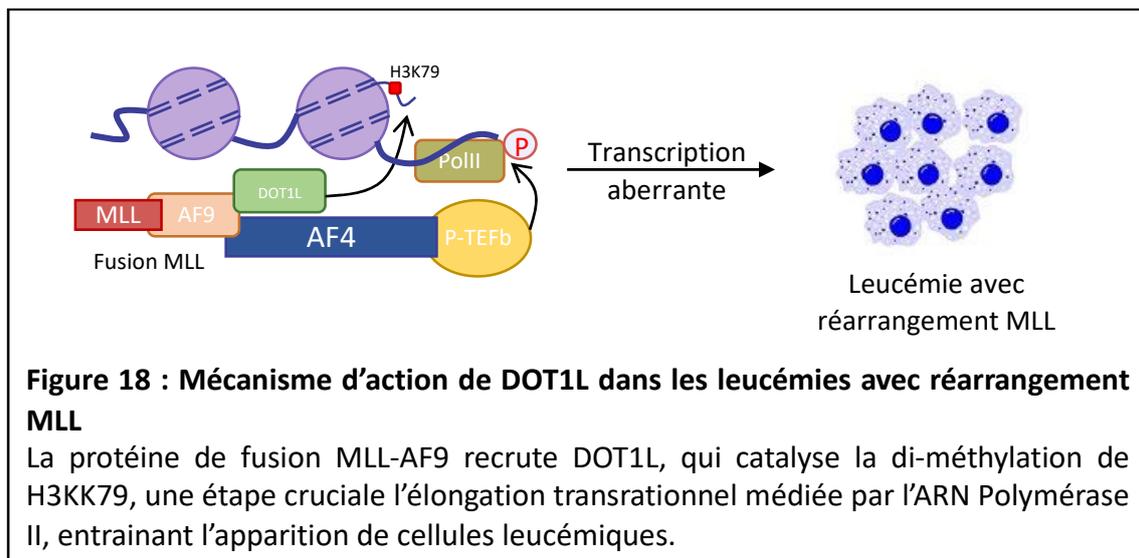
DOT1L est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, et joue notamment un rôle important dans le développement embryonnaire chez la souris. En effet, le *knockout* constitutif (KO) de DOT1L est létal au stade embryonnaire entre E9,5 et E10,5 (*embryonic days*) en raison d'une anémie sévère causée par une angiogenèse défectueuse du sac vitellin et une dilatation du cœur. De plus, *in vitro* les cellules DOT1L KO dérivées de blastocystes ont montré une aneuploïdie, un allongement des télomères et des défauts de prolifération (Jones *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2020). Cependant, DOT1L n'est pas nécessaire à l'autorenouveau des cellules ES mais est requis pour établir la signature d'expression appropriée des cellules progénitrices neurales. En effet, l'inhibition de DOT1L dans les progéniteurs neuronaux entraîne la différenciation neuronale, montrant ainsi que la différenciation neuronale se fait en partie sous le contrôle de DOT1L (Ferrari *et al.*, 2020). De plus, DOT1L est une barrière à la reprogrammation des cellules somatiques en iPS (Onder *et al.*, 2012). DOT1L joue aussi un rôle dans la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines pluripotentes (hES). Il a été observé que lors d'un *knock-down* de DOT1L dans ces cellules, la pluripotence n'est pas altérée, mais la différenciation cardiaque est perturbée (Pursani *et al.*, 2018). DOT1L n'est pas seulement essentiel au développement embryonnaire des mammifères, mais il est également nécessaire après la naissance, par exemple pour l'hématopoïèse. DOT1L joue un rôle important dans l'hématopoïèse développementale, au cours de laquelle les cellules souches hématopoïétiques se différencient, mais aussi à l'âge adulte. En effet AT. Nguyen et ses collègues ont démontré l'importance de DOT1L pour le maintien de l'hématopoïèse adulte normale, avec un *knock-out* conditionnel de DOT1L dans

les cellules de la moelle osseuse chez la souris. Ce *knock-out* entraîne une atteinte du pool de cellules souches hématopoïétiques, et un déficit des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes (Anh T Nguyen *et al.*, 2011).

### C) Rôle de DOT1L dans les leucémies

Outre son importance dans le développement, DOT1L joue un rôle critique dans certaines maladies et notamment les leucémies. Les différents types de leucémies sont classés selon deux critères : la vitesse de développement aiguë ou chronique, et selon le type cellulaire dont la maladie est originaire : cellules myéloïdes ou cellules lymphoïdes. Les leucémies sont donc divisées en quatre groupes : la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), la leucémie aiguë myéloblastique (LAM), la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et la leucémie myéloïde chronique (LMC). DOT1L est impliqué dans les leucémies aiguës dans lesquelles le gène de la leucémie à lignée mixte (MLL : *mixed lineage leukaemia*) est transloqué en 11q23. Les leucémies MLL représentent environ 35 à 50% des LAM pédiatriques et jusqu'à 80% des LAL pédiatriques (Heerema *et al.*, 1999; Balgobind *et al.*, 2011). Ce taux est beaucoup moins important chez l'adulte. Le pronostic des patients atteints de leucémies MLL est particulièrement mauvais en raison des traitements peu efficaces. Certaines de ces leucémies impliquent la protéine MLL1 (aussi connue sous le nom de KMT2A). MLL1 est un membre de la famille SET1/MLL des méthyltransférases qui affectent la structure de la chromatine et l'expression des gènes par la méthylation de H3K4 dans des régions régulatrices clés du génome (Sha *et al.*, 2020). Dans la leucémie à mutation MLL, l'extrémité N-ter de MLL fusionne avec l'extrémité C-ter de divers partenaires de translocation, générant des protéines de fusion qui peuvent se lier à l'ADN ou à la chromatine et induire une transformation leucémique dans les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (Krivtsov and Armstrong, 2007). Parmi ces protéines de translocations, on retrouve AF9 et ENL qui appartiennent à la famille des protéines à domaine YEATS. Ces protéines participent au super complexe d'élongation de l'ARN polymérase II (*SEC super elongated complexe*) comprenant AF4, ENL, pTEFb, et le complexe DotCom. Elles régulent la transcription en recrutant DOT1L et en phosphorylant la ARN Pol II (Yokoyama *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Un sous-ensemble de ces partenaires de translocation MLL entraîne donc un recrutement aberrant de DOT1L, induisant une hyperméthylation de H3K79 et une activation transcriptionnelle constitutive des gènes

nécessaires à la leucémogénèse, notamment l'hyperexpression de HOXA9 et son cofacteur MEIS1 (Meyer *et al.*, 2006; Thiel *et al.*, 2010) (Figure 18). DOT1L est donc une cible intéressante dans la mise au point de nouveau traitement de la leucémie. Ces traitements permettent de cibler les cellules leucémiques MLL et d'induire l'apoptose en inhibant spécifiquement DOT1L.



#### IV) DOT1L et la réponse aux dommages à l'ADN

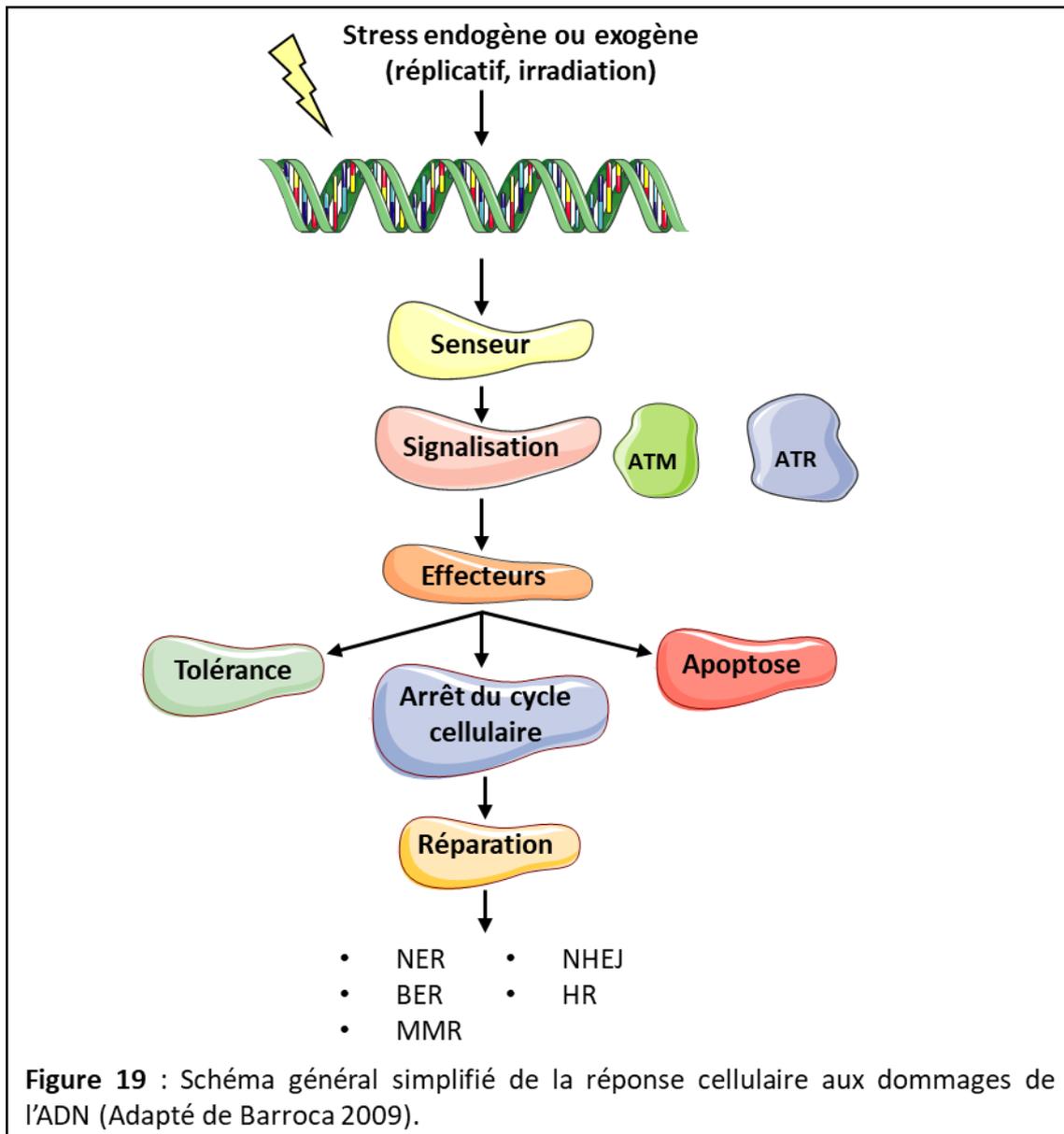
##### A) La réponse aux dommages à l'ADN

La stabilité et l'intégrité du génome sont primordiales pour la survie d'une cellule. La double hélice de l'ADN est en effet soumise à de multiples stress entraînant des altérations de sa structure (dommage physique) et de sa dynamique (dommage chimique). Ces dommages peuvent être d'origine endogène ou exogène. Les dommages endogènes à l'ADN, qui proviennent des processus métaboliques internes, sont causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (Valko *et al.*, 2006; Srinivas *et al.*, 2018). Ces radicaux libres sont formés au cours du stress oxydatif, des processus métaboliques et de la réaction inflammatoire. D'autres sources de dommages endogènes à l'ADN existent comme les lésions causées par des erreurs de nucléotides lors du processus de réplication de l'ADN ou encore les processus de recombinaison. En revanche, les dommages exogènes sont causés par des substances externes et sont essentiellement liés à différents types de rayonnement

(le rayonnement ultraviolet et le rayonnement ionisant) ou à certains cancérigènes environnementaux comme certaines substances retrouvées dans le tabac ou encore les polluants industriels. Ces différentes sources de dommages à l'ADN peuvent entraîner des cassures double-brin (DSB), des cassures simple-brin (SSB), l'excision de nucléotides ou encore des liaisons covalentes ADN-protéine.

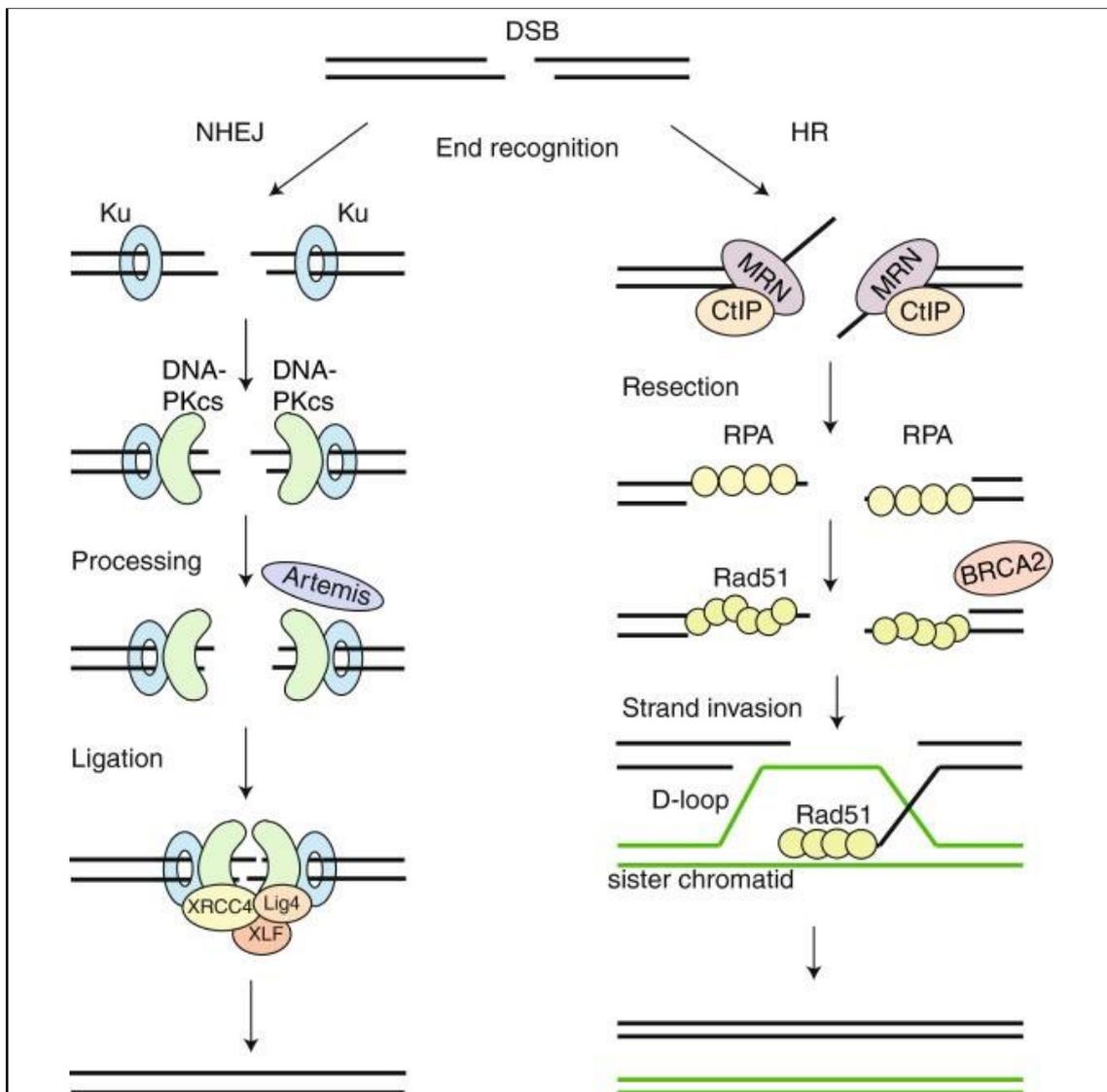
La stabilité du génome est maintenue par la réplication précise et la réparation adéquate de l'ADN. Pour cela au cours de la division cellulaire, les cellules eucaryotes ont développé un certain nombre de mécanismes de surveillance appelés points de contrôle, permettant la réparation de l'ADN. Cependant si les lésions causées à l'ADN sont trop importantes, les cellules sont alors dirigées vers la sénescence ou la mort cellulaire programmée. La défaillance de ces processus cruciaux entraîne des dommages à l'ADN susceptibles de promouvoir des taux de mutation plus élevés, une instabilité chromosomique, ou une aneuploïdie. Cette intégrité du génome est d'autant plus primordiale dans les cellules germinales, et notamment les cellules souches, car elles assurent la transmission du patrimoine génétique au descendant.

Lors d'un dommage de son génome, la cellule initie la réponse aux dommages à l'ADN (DDR : *DNA damage response*). Celle-ci engage une activité enzymatique critique pour identifier, signaler et favoriser la réparation des lésions de l'ADN (Figure 19). Une cascade de signalisation complexe est alors mise en place, commençant par des « senseurs » qui détectent les lésions. Ils vont alors recruter et activer des protéines kinases tels que ATM, ATR ou DNA-PK qui vont médier la DDR, et des voies moléculaires qui régulent notamment le contrôle du cycle cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN, et l'apoptose. La cellule dispose de plusieurs voies de réparation en fonction du type de dommage, comme par exemple les voies de réparations des SSBs : MMR (*Mismatch Repair*) pour la réparation des mésappariements (Modrich 1991), BER (*Base Excision Repair*) pour l'élimination et le remplacement de bases endommagées de l'ADN (Dianov and Hübscher, 2013) ou encore NER (*Nucleotide Excision Repair*) pour l'élimination des adduits de l'ADN (Dijk *et al.*, 2014).



Les DSBs constituent une forme particulièrement délétère de dommage à l'ADN et sont réparés par deux voies principales : c-NHEJ, la jonction classique des extrémités non homologues, elle permet le traitement et la ligation des extrémités coupées de l'ADN. Cependant le c-NHEJ est une voie de réparation infidèle, sujet à des erreurs et est considéré comme mutagène. En effet, le traitement des extrémités avant ligation entraîne souvent la perte ou le gain d'information (Ma *et al.*, 2004; Scully *et al.*, 2019). La deuxième voie principale est la HR, recombinaison homologue. Contrairement à la voie NHEJ qui est active tout au long du cycle cellulaire, la réparation par HR est limitée aux phases S et G2 du cycle cellulaire, lorsque les chromatides sœurs répliqués sont disponibles pour servir de matrice de

réparation. Cette voie de réparation est considérée fidèle comme sans erreurs (Kass *et al.*, 2013; Scully *et al.*, 2019) (Figure 20).



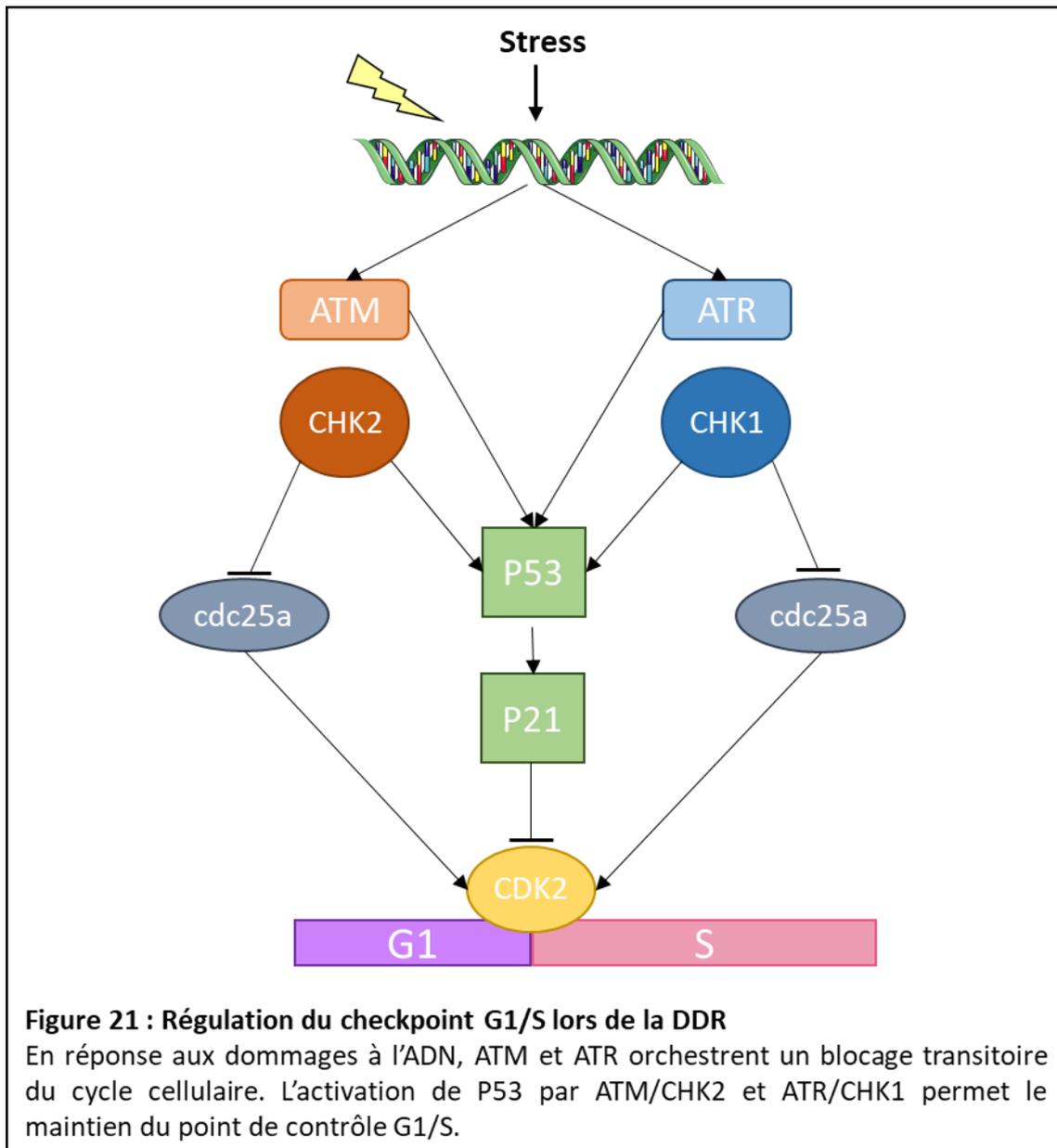
**Figure 20 : Réponses aux dommages à l'ADN, NHEJ et HR**

Dans la voie NHEJ, les extrémité de l'ADN sont reconnus par Ku70/80, qui recrute les DNA-PKcs permettant de rapprocher les deux brins. Artémis vient couper les extrémités pour assurer leur compatibilité, puis les protéines d'échafaudages XRCC4, LIG4 et XLF viennent sceller les extrémités.

Dans la voie HR, MRN et CtIP génèrent de l'ADN simple brin, RPA vient enrober cet ADN, puis est remplacé par Rad51 à l'aide de BRCA2, permettant la restauration et la réparation de l'ADN (Adapté de Brandsma *et al.* 2012).

En réponse aux dommages à l'ADN, les cellules vivantes sont arrêtées dans leur cycle cellulaire par des points de contrôle, soit pour permettre la réparation de l'ADN, soit pour favoriser la mort cellulaire si les lésions sont trop importantes. Ces mécanismes de régulation

sont importants et permettent de maintenir l'intégrité de l'ADN (Barnum and O'Connell, 2014). À la suite d'un dommage à l'ADN les kinases ATM et ATR vont phosphoryler et activer les kinases de point de contrôle CHK1 et CHK2, qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire dans les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire, ce qui favorise la réparation de l'ADN. Ces transducteurs de signaux activent p53 et inactivent les kinases cycline-dépendantes pour inhiber la progression du cycle cellulaire de G1 à S (le point de contrôle G1/S), la réplication



de l'ADN (le point de contrôle intra-S), ou de G2 à la mitose (le point de contrôle G2/M) (Sancar *et al.*, 2004; Bartek and Lukas, 2007) (Figure 21). Après irradiation par exemple, le point de contrôle à la transition G1/S médié par la p53 et p21 peut durer plusieurs heures. Selon

l'intensité de la dose de radiation, l'activation de p53 est dépendante soit d'ATM à faible dose, soit d'ATR à forte dose (Li *et al.*, 2021). De plus, lors d'un stress génotoxique les cellules doivent rapidement arrêter leur cycle. Pour cela, il y a une dégradation protéique rapide, dépendante de l'ubiquitine et du protéasome, de Cdc25A, une phosphatase nécessaire à la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Cette réponse implique l'activation des protéines kinases CHK1/2 mais pas la voie p53 (Mailand *et al.*, 2000) (Figure 21).

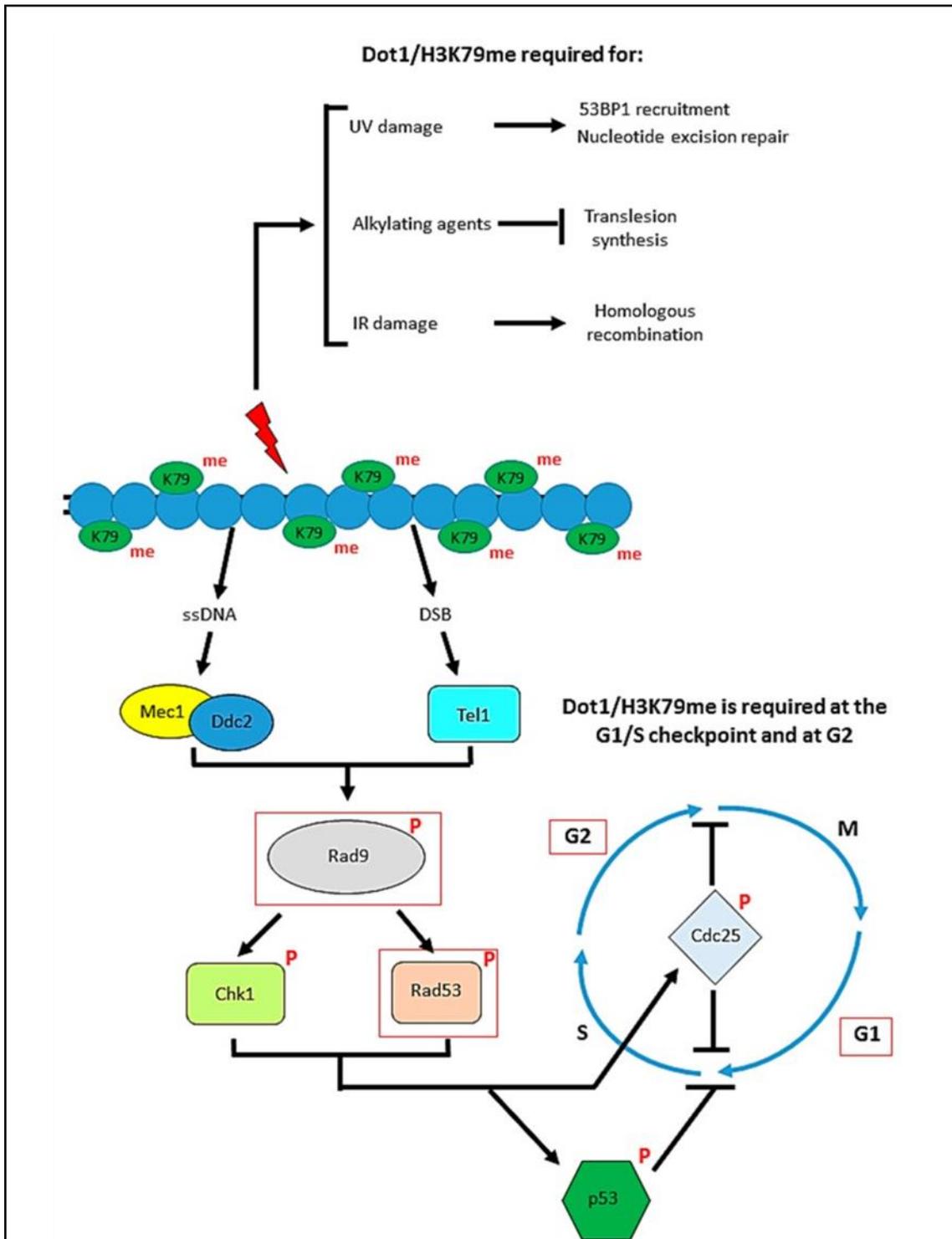
### **B) Dynamique chromatinienne dans la réponse aux dommages à l'ADN, rôle de DOT1L**

Chez les eucaryotes, la dynamique de la chromatine joue un rôle important dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. En effet, les modifications de la chromatine, pouvant altérer la stabilité de l'octamère d'histone sur l'ADN, régulent le recrutement des machines moléculaires assurant la transcription, la réplication et la réparation. Ainsi, lors de la réponse aux dommages à l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et des protéines de réparations sont activées (Rossetto *et al.*, 2010). Notamment, on retrouve des interactions entre la réparation des DSB et l'environnement chromatinien comme la phosphorylation rapide de H2AX par ATM (Caron *et al.*, 2015), ou encore le contrôle de la relaxation de la chromatine au niveau des cassures par les histones acétylase et déacétylase (Jacquet *et al.*, 2016). De même, les histones méthyltransférases et déméthylases peuvent réguler le recrutement et/ou la stabilisation des protéines de réparation (Dulev *et al.*, 2014). Enfin l'ubiquitination et la sumoylation jouent un rôle important dans la réorganisation de la chromatine après DSB (Schwertman, Bekker-Jensen and Mailand, 2016). Les différentes voies de réparation des DSB possèdent une cartographie spécifique des modifications des histones (Clouaire *et al.*, 2018). Une éviction de H3, H2AZ et H1, une incorporation de macroH2A, la déacétylation de H4K16, la monométhylation de H4K20 ont été notamment observées. Après induction de DSB, ils notent une diminution de H3K79me2 et H2BK120ub, produit spécifiquement au niveau des DSB susceptibles de subir une HR.

Des études menées à la fois chez la levure et chez les mammifères ont démontré l'existence d'un lien entre la présence de DOT1L, la méthylation de H3K79 et la réponse aux dommages à l'ADN. Pour réparer les dommages à l'ADN, les modifications d'histones recrutent la protéine 1 de liaison du suppresseur de tumeur p53 (53BP1) sur les sites de

dommages à l'ADN. La protéine 53BP1 est alors hyperphosphorylée et produit des foyers nucléaires colocalisés avec H2AX phosphorylée ( $\gamma$ H2AX) (Rappold *et al.*, 2001). Chez la levure et chez les mammifères, lors d'une cassure doubles brins le domaine Tudor de la protéine de réparation de l'ADN 53BP1 (et son orthologue Rad9 chez la levure) se lie à H3K79me et est recruté aux cassures doubles brins (Huyen *et al.*, 2004; Wysocki *et al.*, 2005). Plus précisément, la méthylation de H3K79 par DOT1L est observée pendant le processus de réparation, et la délétion de DOT1L réduit la réparation de l'ADN. DOT1L joue un rôle essentiel dans la réparation des dommages à l'ADN en phase G2 tardive. Cependant, de récentes études suggèrent que H4K20me<sub>2</sub>, et non pas H3K79me<sub>2</sub>, est la principale marque d'histone responsable du recrutement de 53BP1, mais celui-ci reste important si la méthylation de H4K20me<sub>2</sub> est déficiente (Botuyan *et al.*, 2006). La formation des foci 53BP1 est favorisée par la protéine HLA-B associée au transcrit 3 (BAT3). En effet, BAT3 est impliqué dans la diméthylation de H3K4 permettant la régulation transcriptionnelle des gènes et l'apoptose induite par les dommages à l'ADN. Il a été démontré que BAT3 et DOT1L colocalisent lors de dommage à l'ADN pour faciliter la diméthylation de H3K79 par DOT1L, favorisant ainsi la formation des foci 53BP1 en phase G1/G2 du cycle cellulaire (Wakeman *et al.*, 2012).

Chez les levures, l'induction de dommages à l'ADN après irradiation (IR) en phase G1 entraîne un retard du point de contrôle G1 dans le cycle cellulaire. Il est intéressant de noter que les mutants de Dot1 sont défectueux au niveau des points de contrôle G1 et intra-S et progressent normalement dans le cycle cellulaire même après des dommages à l'ADN induits par l'IR (Wysocki *et al.*, 2005). Bien que les mutants délétés pour Dot1 ne présentent pas de phénotype d'arrêt en G2, Dot1 est nécessaire au recrutement de Rad9 aux foyers de dommages et la phosphorylation de Rad53 (orthologue de CHK1/2) en cas d'IR (Toh *et al.*, 2006). La méthylation de H3K79 médiée par Dot1 jouerait deux rôles distincts dans la réponse aux dommages de l'ADN médiée par Rad9 : l'activation du point de contrôle G1/S et la réparation des dommages de l'ADN à la fin de la phase G2 (Grenon *et al.*, 2007) (Figure 22).



**Figure 22 : Rôle de Dot1 dans la réponse aux dommages à l'ADN chez la levure**  
Après dommages à l'ADN, deux voies de réparation peuvent être utilisées. Dans les deux cas Dot1 est nécessaire pour la réparation médiée par HR et NHEJ. Dot1 est également nécessaire pour la fonction de point de contrôle en G1 et G2, et la méthylation de H3K79 par Dot1 est essentielle pour le recrutement de Rad9, permettant à la cellule d'entrer dans un phénotype d'arrêt à G1/S ou G2 après un dommage à l'ADN.



# Objectifs



Les cellules souches possèdent la capacité unique de s'autorenouveler pour maintenir leur réserve et de se différencier vers une voie plus spécialisée. Les cellules souches de la lignée germinale ont pour rôle crucial de maintenir la production de gamètes tout au long de la vie adulte, permettant ainsi le transfert transgénérationnel de l'information génétique à la descendance. L'altération des mécanismes d'autorenouvellement et de différenciation des CSGs peut entraîner la perte de la réserve de cellules souche et ainsi des problèmes d'infertilité, ou encore une prolifération cellulaire incontrôlée entraînant l'apparition de tumeurs germinales. D'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaire gouvernant l'autorenouvellement et la différenciation des CSGs chez les organismes modèles comme la souris. Cependant, une meilleure compréhension de ces mécanismes reste encore aujourd'hui nécessaire pour comprendre l'interaction complexe des réseaux de régulation au cours du développement de la lignée germinale chez l'Homme.

En France, environ 2200 cas de cancers sont diagnostiqués chaque année chez les enfants. En raison des progrès réalisés dans le traitement et la prise en charge de la maladie, le taux de survie de ces cancers est de plus de 80% (source : Institut National du Cancer). Chez ces patients traités par chimiothérapie et/ou radiothérapie, un des effets secondaires majeurs à long terme qui altère la qualité de vie après guérison est la menace sur la fertilité, due à l'atteinte et la déplétion du réservoir de CSGs. L'un des objectifs du plan cancer 2014-2019 pour réduire les risques de séquelles était de prendre en compte la problématique de la préservation de la fertilité. L'étude des effets des chimiothérapies sur les cellules souches devrait permettre d'optimiser les protocoles thérapeutiques et de minimiser leurs effets secondaires sur ce réservoir de cellules et sur la fertilité des patients.

De plus, le développement de nouvelles technologies en reproduction humaine est nécessaire afin d'apporter des solutions curatives aux troubles de la fertilité consécutifs aux traitements anticancéreux. Différentes thérapies pour les problèmes d'infertilité ont été envisagées, comme la transplantation testiculaire de CSGs, l'autogreffe de fragment testiculaire, afin de produire des spermatozoïdes, ainsi que la spermatogenèse *in vitro* à partir de cellules souches ou de fragments testiculaires.

Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation des cellules souches germinales. Comme précédemment vu dans l'introduction, l'identité des CSGs humaines ainsi que les mécanismes régulant leur fonction d'autorenouvellement et de différenciation, restent peu

connus, malgré les récentes avancées dans ce domaine, notamment grâce aux approches de scRNAseq. La première partie de mon travail de thèse a été consacrée à mieux définir la population des CSGs chez l'Homme. Pour cela nous avons développé un nouveau panel de 14 marqueurs cellulaires, nous permettant ainsi par cytométrie spectrale de mieux décrire et résoudre la complexité des populations germinales et de leur hiérarchie dans le testicule. Grâce à l'utilisation d'un nombre important de biomarqueurs, combiné à une approche bioinformatique, nous avons réalisé une caractérisation plus fine des populations des progéniteurs spermatogoniaux immatures et des cellules souches.

La deuxième partie de mon travail a porté sur l'étude du rôle de l'histone méthyltransférase DOT1L dans la régulation du destin des CSGs dans le modèle murin. Nous avons réalisé cette étude en collaboration avec l'équipe de Julie Cocquet (Institut Cochin). Des preuves croissantes suggèrent que les mécanismes épigénétiques jouent un rôle central dans les mécanismes de régulation des cellules souches. Ils sont essentiels pour déterminer l'expression des gènes lors de la prise de décision par les cellules souches quant à leur destin cellulaire. De plus, nous avons récemment réalisé un profil transcriptomique des spermatogonies immatures humaines, montrant que AF9/MLL3, partenaire moléculaire de DOT1L, est l'un des régulateurs transcriptionnels les plus exprimés dans cette population. Enfin, l'avènement des thérapies ciblées, et la perspective de cibler DOT1L dans le traitement des leucémies avec réarrangement impliquant MLL, notamment chez les enfants prépubères, soulignent l'importance d'étudier le rôle de DOT1L afin d'évaluer les conséquences de tels traitements sur la fertilité.

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à d'autres études sur les CSGs dans l'équipe et en collaboration avec l'équipe de Déborah Bourc'his, ainsi qu'à des revues, qui ont donné lieu à plusieurs publications.

1. Givelet, M., **Lapoujade, C.** & Fouchet, P. Competition for Food Drives Stem Cell Fate in Facultative Niches. *Cell Stem Cell* **24**, 1–2 (2019).
2. Gille, A.-S., **Lapoujade, C.**, Wolf, J.-P., Fouchet, P. & Barraud-Lange, V. Contribution of Single-Cell Transcriptomics to the Characterization of Human Spermatogonial Stem Cells: Toward an Application in Male Fertility Regenerative Medicine? *Int J Mol Sci* **20**, (2019).

3. Givelet, M.; Firlej, V.; Lassalle, B.; Gille, A. S.; **Lapoujade, C.**; Holtzman, I.; Jarysta, A.; Haghghirad, F.; Dumont, F.; Jacques, S.; Letourneur, F.; Pflumio, F.; Allemand, I.; Patrat, C.; Thiounn, N.; Wolf, J. P.; Riou, L.; Barraud-Lange, V.; Fouchet, P. Transcriptional Profiling of  $\beta$ -2M-SP $\alpha$ -6+THY1+ Spermatogonial Stem Cells in Human Spermatogenesis. Stem Cell report (2022)
4. Jarysta, A.; Riou, L.; Firlej, V.; **Lapoujade, C.**; Kortulewski, T.; Barroca, V.; Gille, A.-S.; Dumont, F.; Jacques, S.; Letourneur, F.; Rosselli, F.; Allemand, I.; Fouchet, P. Abnormal Migration Behavior Linked to Rac1 Signaling Contributes to Primordial Germ Cell Exhaustion in Fanconi Anemia Pathway-Deficient Fancg<sup>-/-</sup> Embryos. Hum Mol Genet 2021, ddab222. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab222>
5. Dura, M.; Teissandier, A.; Armand, M.; Barau, J.; **Lapoujade, C.**; Fouchet, P.; Bonneville, L.; Schulz, M.; Weber, M.; Baudrin, L. G.; Lameiras, S.; Bourc'his, D. DNMT3A-Dependent DNA Methylation Is Required for Spermatogonial Stem Cells to Commit to Spermatogenesis. Nat Genet 2022, 54 (4), 469–480. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01040-z>.



# Résultats



## I) Caractérisation des cellules souches germinales humaines : étude par cytométrie spectrale d'un nouveau panel de 14 marqueurs cellulaires

### **Contexte et objectif de l'étude :**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nouvelles thérapies basées sur l'utilisation des CSGs sont développées afin de traiter l'infertilité chez l'homme. L'état actuel des connaissances chez l'animal permet en effet d'envisager par exemple la transplantation de CSGs. Une production efficace de spermatozoïdes fonctionnels après transplantation testiculaire a été rapportée chez des primates non humains, de même qu'une autogreffe de tissu testiculaire (Hermann *et al.*, 2012; Jahnukainen *et al.*, 2012; Fayomi *et al.*, 2019).

Les connaissances fondamentales sur les CSGs ont grandement bénéficié d'études dans les organismes modèles et le modèle murin. Comme pour d'autres types de cellules souches, l'identité et le processus de différenciation du pool de cellules souches sont basés sur un modèle hiérarchique, même si un modèle plus stochastique de régulation d'une population cellulaire équipotente en terme de potentiel d'autorenouvellement, est apparue pour expliquer la maintenance des CSGs (Hara *et al.*, 2014; Kitadate *et al.*, 2019). Chez l'homme, le pool de cellules souches germinales et les mécanismes moléculaires régissant leur autorenouvellement et entrée en différenciation sont encore mal compris, même si des études récentes de scRNAseq ont contribué à définir différents états cellulaires des SSC dans le pool spermatogonial primitif (Guo *et al.*, 2018; Hermann *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019a; Shami *et al.*, 2020; Di Persio *et al.*, 2021). Cependant, ce type d'approche reste limité par l'impossibilité d'isoler ces sous-populations cellulaires pour étudier leur fonction. Pour caractériser l'hétérogénéité du pool de spermatogonies, les approches multidimensionnelles comme le scRNAseq mettent en évidence l'intérêt de détecter simultanément avec une haute résolution de nombreux paramètres à l'échelle de la cellule unique. L'approche par cytométrie en flux et les développements récents tels que la cytométrie spectrale, permettant la caractérisation multiparamétrique à haut débit de cellules individuelles en suspension, sont des outils intéressants pour la caractérisation du phénotype

et de la fonctionnalité cellulaire, ainsi que la résolution de la complexité du pool de CSGs humaines.

Bien que plusieurs protéines de surface cellulaire aient été décrites permettant de sélectionner des populations de spermatogonies humaines présentant un potentiel de régénération après transplantation testiculaire (Zohni *et al.*, 2012; Dovey *et al.*, 2013; Nickkholgh *et al.*, 2014; Valli *et al.*, 2014; Shami *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020), des marqueurs phénotypiques fiables permettant la purification et l'étude de populations de cellules souches et de progéniteurs font défaut, ce qui entrave l'étude du potentiel d'autorenouvellement et de régénération des CSGs humaines. Les cellules souches sont retrouvées dans les fractions de cellules testiculaires exprimant l'intégrine  $\alpha$ -6, CD9, SSEA-4, Thy-1, TSPAN33, EpCAM et PLPPR3. En effet des tests fonctionnels après transplantation dans les tubules séminifères de souris immunodéficientes ont montré une colonisation du testicule receveur par les populations de spermatogonies exprimant ces marqueurs (Izadyar *et al.*, 2011; Zohni *et al.*, 2012; Dovey *et al.*, 2013; Valli *et al.*, 2014). D'autre part, dans un travail auquel j'ai participé, nous avons récemment caractérisé les CSGs humaines à l'aide de plusieurs marqueurs (Side Population-SP,  $\alpha$ -6 intégrine, Thy-1, et  $\beta$ -2 microglobuline). Des tests de fonctionnalité (culture *in vitro* à court terme, régénération après transplantation dans des testicules de souris immunodéficientes NSG) ont montré que les CSGs adultes étaient présentes et hautement enrichies dans la sous-population cellulaire SP $\alpha$ 6+Thy-1+ $\beta$ 2M-. Un profil transcriptomique a été défini pour la fraction SP $\alpha$ 6+Thy-1+ $\beta$ 2M- hautement enrichie en CSGs, nous avons montré que ce profil recouvrait celui des stades ou états souches décrits par les approches scRNAseq (Givelet *et al.*, 2022).

Pour mon travail de thèse, j'ai conçu un panel combinatoire de 14 marqueurs qui nous a permis par cytométrie spectrale de caractériser plus finement les populations de

spermatogonies et d'établir une meilleure hiérarchisation des stades successifs des spermatogonies primitives. Elle fournit des informations sur l'hétérogénéité des cellules spermatogoniales humaines d'une manière non délétère pour l'intégrité et la viabilité des cellules, permettant des études futures de leur fonctionnalité. Les résultats de ce travail sont présentés sous forme d'un article en cours de finalisation qui sera soumis pour publication (manuscrit ci-après).



**14-colors panel phenotypic characterization of the stem cell and progenitor hierarchy in human spermatogenesis by spectral cytometry**

C. Lapoujade<sup>1</sup>, M. Givelet<sup>1,2</sup>, A.S Gille<sup>1,2</sup>, I. Allemand<sup>1</sup>, L. Lenez<sup>3,4</sup>, C. Patrat<sup>3,4</sup>, N. Thiounn<sup>4</sup>, S. Roux<sup>4</sup>, J.P. Wolf<sup>3,4</sup>, L. Riou<sup>1</sup>, V. Barraud-Lange<sup>3,4</sup>, P. Fouchet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Paris and Université Paris-Saclay, CEA, UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, iRCM/IBFJ, Laboratoire des Cellules Souches Germinales, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>2</sup> Institut Cochin, Inserm U1016, Département de Génétique, Développement et Cancer. Équipe Génomique Epigénétique et Physiopathologie de la Reproduction, F-75014, Paris, France

<sup>3</sup> UFR Médecine Paris Centre-Université de Paris, 15 rue de l'école de Médecine, F-75006, Paris, France.

<sup>4</sup> Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Paris Centre, CHU Cochin, Histologie-Embryologie-Biologie de la reproduction, F-75014, Paris, France.

<sup>5</sup> Université Paris Saclay, UMS IPSIT, F-92296, Châtenay-Malabry, France

<sup>6</sup> Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, U1016, CNRS UMR8104, Plateforme Séquençage et Génomique F-75014, Paris, France

Corresponding author and Lead contact: Pierre Fouchet, [pierre.fouchet@cea.fr](mailto:pierre.fouchet@cea.fr)

## ABSTRACT

About one in six couples experience fertility issues, and male infertility is responsible for approximately half of cases. Spermatogenesis originates in a small pool of spermatogonial stem cells (SSCs), that are of interest for therapy of infertility, but remain barely characterized in humans. Using multiparametric flow spectral analysis with a 14-colors panel of cell markers, we identify new markers of SSCs and provide insights to unveil and resolve the heterogeneity of the human spermatogonial cell heterogeneity. This 14-C panel of markers allowed to identify a primitive SSCs state harboring the  $\beta$ -2M<sup>-</sup>CD51/61<sup>-</sup> $\alpha$ -6<sup>+</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup>CD148<sup>+</sup>CD47<sup>high</sup>CD7<sup>high</sup> phenotype, with a profile close to the most primitive SSCs state 0 and state SSC1-B previously defined by sc-RNAseq approach. The hierarchy of events in the spermatogonial stem cell and progenitor compartment of human spermatogenesis was delineated. This highlights the importance of multi-parametric and in depth characterization of testicular cells using spectral cytometry. This should help to tackle the shortcomings of stem cell knowledge, that hinder the understanding of the regenerative potential of SSCs that is a critical parameter for the successful development of new SSCs-based cell therapy

## INTRODUCTION

Regenerative medicines based on spermatogonial stem cells (SSCs) are of great interest to treat for infertility issues. Efficient production of functional sperm after testicular transplantation was reported in non-human primates, as well as the successful autograft of testicular tissue to produce sperm (Hermann *et al.*, 2012; Fayomi *et al.*, 2019). As in other tissue in continuous renewal, the pool of SSCs ensures the spermatogenesis in adult through self-renewal and differentiation to produce sperm. The basic knowledge on SSCs greatly benefited from studies in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and murine models, and SSCs identity based on a hierarchical basis, or on a more stochastic model tuning the differentiation of a larger subset of SSCs and early progenitors equipotent in term of stemness, emerged to regulate the fate of the stem cell pool (Oatley and Brinster, 2012; Hara *et al.*, 2014; Rooij, 2017).

In human, the spermatogonial stem cell pool and the molecular mechanisms governing their fate are still poorly understood, even if recent scRNAseq studies contributed remarkably to define different cell SSCs states in the primitive spermatogonial pool (Guo *et al.*, 2018; Hermann *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019b; Shami *et al.*, 2020; Di Persio *et al.*, 2021). However, such approach is also limited by the impossibility to isolate these subsets of cells to study their function. The multidimensional approach of scRNAseq highlights the requirement to use numerous cellular parameters simultaneously in single cells to characterize with high resolution the heterogeneity of the spermatogonial pool. Flow cytometry approach and recent development such as spectral cytometry enabling high throughput multi-parametric characterization of single cells in suspension could facilitate the characterization of cell phenotype and functionality, and the resolution of the complexity of the human SSCs pool necessary for the development of new therapies.

Here, we generated a 14-colors panel of markers allowing high throughput multi-parametric and in depth characterization of single testicular cells using spectral cytometry facilitating the characterization of the different germinal populations. This study allowed to identify new markers of SSCs and provides insights to unveil and resolve the heterogeneity of the human spermatogonial cell heterogeneity in a non deleterious manner for cell integrity and viability, allowing future studies of their functionality.

## RESULTS

### **Development of 8-C fluorescent panel to discriminate SSCs populations**

We recently identified a spermatogonial subpopulation highly enriched in SSCs with the phenotype Side population(SP) $\beta 2M^{-}\alpha\text{-}6^{+}\text{THY}1^{+}$  population using a 5-color panel (Givelet *et al.*, 2022). Starting from this set of markers, we aimed to add new markers to apply multi-parameter flow cytometry strategy to characterize further human spermatogenesis and to improve the delineation of the SSCs identity. First, TSPAN33, FGFR3 and SSEA4 which were previously described to be expressed on SSCs and primitive spermatogonia were added to our  $\beta 2M$ ,  $\alpha\text{-}6$ , and THY1 panel of markers, along with the KIT receptor allowing to discriminate differentiating from primitive spermatogonia (Izadyar *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2020; Givelet *et al.*, 2022). Side population marker was discarded from this 8-C panel in order to offer new possibilities of fluorochromes to be used on the violet or UV lasers. The use of Vybrant or Hoechst 33342 DNA dye indeed prevents the detection of a higher number of markers.

Viable cells were analyzed using forward and side scatter to remove elongated spermatids and sperm from further analyses, and single cells were selected on FSCA-FSCW (Fig1A). After gating for  $\beta\text{-}2M^{-}$  cells to remove somatic cells, we were able to resolve a subpopulation of  $\alpha\text{-}6^{+}$  cells expressing SSEA4, FGFR3, or TSPAN33. SSEA4<sup>+</sup> population splits into 2 subpopulations according to the expression of KIT (Fig. 1A). The  $\beta 2M^{-}\alpha\text{-}6^{+}\text{THY}1^{+}$  population contains the spermatogonia expressing SSEA4, FGFR3, and the fraction of cells expressing TSPAN33 (Fig 1B). TSPAN33 expression clearly discriminated in the SSEA4<sup>+</sup> population a subpopulation representing 0.26% of the germinal cells, coexpressing THY1 but negative for KIT receptor (Fig. 1C). SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup> cells are a composite of THY1<sup>+</sup>KIT<sup>-</sup> cells and THY1<sup>-</sup>KIT<sup>+</sup> cells.

To enable comprehensive analysis of the resulting multi-dimensional dataset, we investigated the projection of flow data onto a common UMAP scaffold analogous to representations of high-dimensional transcriptomic data. We first tested the potential of this approach on the 5-C SP $\beta 2M^{-}\alpha\text{-}6^{+}\text{THY}1^{+}$  analysis (Fig. S1A) (Givelet *et al.*, 2022). FlowSOM

analysis was used that groups cells with similar expression patterns into nodes and gathers these nodes in metaclusters according to their similarities. We observed that the different germinal populations, that we previously characterized (Givelet *et al.*, 2022), could be discriminated when flow data from testicular cells were projected on a UMAP (Fig S1B). Thus, clustering and manual gating analysis showed a high concordance. The minimal spanning tree inferred from this analysis allows also to reproduce the successive steps of spermatogenesis (Fig S1C).

Then, 685 731 viable total testicular single cells stained with the 8-C panel (comprising the markers  $\beta 2M$ ,  $\alpha -6$ , THY1, SSEA4, FGFR3, TSPAN33, KIT) were analysed, and the  $\beta 2M^-$  fraction was projected onto a common dimensionality reduction UMAP plot (Figure 1D). The major cell subsets obtained by manual gating (see Fig. 1A, B and C) were overlaid on UMAP plots and all the subsets formed well defined clusters (Figure 1D). The clusters of SSEA4<sup>+</sup> and  $\alpha -6^+$  spermatogonial populations were clearly separated from meiotic and postmeiotic  $\alpha -6^-$  cells (loss of expression of  $\alpha -6$  integrin). The dimensionality reduction visualizations succeeded in distinguishing relatively minor populations such as SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup> and SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> spermatogonial populations. Heatmap overlay of all the markers on UMAP plot shows the higher expression of THY1 in the primitive spermatogonial cluster, with an heterogeneous level of expression of FGFR3, TSPAN33 and SSEA4, and this cluster is negative for the KIT receptor (Fig. S2). KIT expression underlines the transition from primitives to more advanced differentiating spermatogonial states.

### **Screen for new markers to decipher human spermatogonial stem and progenitor cells**

In order to find out new markers, we first selected membrane receptors previously described in transcriptomes or sc-RNAseq from human germinal cell populations, or markers of murine SSCs assuming that mouse and human models share some characteristics, or markers of stem cell from other tissues (Guo *et al.*, 2018; Hermann *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019b; Shami *et al.*, 2020; Di Persio *et al.*, 2021). For the screening, we investigated in the  $\beta 2M^- \alpha -6^+ THY1^+$  population the expression of the candidate markers we selected (CD7, TSPAN8, CD47, CD77, CD24, CD155, CD184, CD148, CD51/CD61, CD130, EphB2, CD115, CD146, CD226, CD304/NRP1, CD334/FGFR4, and CD75). Among these 17 markers, a

fraction of  $\beta 2 M^{-} \alpha - 6^{+} \text{THY} 1^{+}$  cells were positive for the expression of CD7, CD155, CD148, CD47, or CD130 (Fig 2). The others markers were negative for the clones of antibodies we used for the screening. We assigned also meiotic and post meiotic populations according to the expression of CD148, CD47, CD155 and  $\alpha - 6$  integrin (Fig. S3). DNA content via Hoechst staining was used to define  $\beta - 2 M^{-} \alpha - 6^{\text{med}} \text{Thy} - 1^{-}$  “S-phase” corresponding to late replicating differentiating spermatogonia, spermatocyte (4N), spermatocyte II (2N), and spermatids (N) germinal populations, as previously described (Givelet *et al.*, 2022).

### **High throughput multi-parametric and in depth characterization of human SSCs and spermatogenesis using a 14-C panel and spectral flow cytometry**

To further extend the cell surface marker characterization of human SSCs and spermatogenesis, adult testicular cell samples were profiled by flow cytometry using a 14-C antibody panel ( $\beta - 2 M$ , CD51/61,  $\alpha - 6$ , SSEA4, TSPAN33, FGFR3, THY1, CD47, CD7, CD148, CD155, CD130, KIT), based on the 8-C panel supplemented with new markers that we identified as expressed in the  $\beta 2 M \alpha - 6^{+} \text{THY} 1^{+}$  population or that was informative to discriminate the other germinal populations. We benefited of spectral cytometry to phenotype adult testicular cell suspension. The different signals from these 14 markers were resolved by spectral deconvolution and the autofluorescence (AF) of the cells was extracted. Figure 3 shows the manual gating strategy for the 14-color panel used in this study. Initially, testicular single living (Hoechst 33258 negative) cells were selected by analyzing FSC pulse height versus area. Sperm cells were removed from analysis by a gating based on the FSC and SSCs from 405 nm laser parameters. Testicular cells were subsequently divided according to somatic cell marker  $\beta 2 M$ , and the integrin complex CD51/CD61 known as  $\alpha v \beta 3$ . CD51/CD61 is expressed in testicular Leydig stem cells and macrophages, and used in murine marker panel to discriminate negatively spermatogonia (Shinohara *et al.*, 2000; Zang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019). As shown in Fig3A, human testicular CD51/61<sup>+</sup> cells are also positive for  $\beta 2$ -microglobulin. Cells negative for CD51/61 and  $\beta 2 M$  markers were subsequently gated for analysis of germinal cells.  $\alpha - 6^{+}$  positive cells were SSEA4<sup>+</sup> whereas  $\alpha 6^{\text{med}}$  cells did not express SSEA4. We subsequently divided spermatogonial populations using SSEA4 and TSPAN33 markers (Fig. 3A). The other markers were analysed according to the defined SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> (0.13 % - Fig. 3B), SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup> (0.99%-Fig. 3C) and SSEA4<sup>-</sup> (Fig. 3D) cell populations. We

observed higher expression levels of CD7, CD47, CD148, and CD155 in SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> population than in SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup>. THY1 and FGFR3 were expressed at the same level in SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> cells and SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup> populations. SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> cells did not express KIT receptor, while a fraction of SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup> expressed KIT. The different germinal subpopulations were defined to describe the different differentiation stages of spermatogenesis according to the expression of the 13 markers as shown in Fig. 3 and Fig. S3.

To enable comprehensive analysis of the resulting multi-dimensional dataset, viable total testicular cells (1, 1 111 456 cells) were first projected into the same UMAP space (Fig 4A). The spermatogonial, meiotic and postmeiotic cell subsets obtained by manual gating as shown in Fig3 and FigS3 were overlaid on UMAP dimensionality reduction plots (Fig 4B) and all the subsets formed well defined clusters. We discriminated somatic cell populations ( $\beta 2M^+CD51/61^+$  and  $\beta 2M^+CD51/61^-$  cells) from germinal populations. We distinguished meiotic (4N and 2N) and post meiotic (N) cells from spermatogonial populations. In addition, primitive spermatogonial population ( $\alpha 6^+SSEA4^+$  and  $\alpha 6^+THY1^+$  cells) was clearly separated from differentiating spermatogonia, showing that the dimensionality reduction visualization was able to separate minor populations of spermatogonia. Heatmap overlay of all the markers on UMAP plot (Fig 4C) show that  $\alpha 6$ -integrin, SSEA4, THY1, TSPAN33, FGFR3, CD7, CD47, CD155 and CD148 markers, but not KIT, were expressed in the primitive spermatogonial subset.

Then, we focused the analysis on  $\beta 2M^-CD51/61^-\alpha 6^+$  whole spermatogonial population and the  $\beta 2M^-CD51/61^-\alpha 6^+THY1^+$  primitive spermatogonia. Adult testicular cell suspension of 3 patients with normal spermatogenesis were phenotyped and data were concatenated in order to take into account a higher number of spermatogonia in the analysis. 89,075  $\beta 2M^-CD51/61^-\alpha 6^+$  were projected into UMAP spaces (Fig 5A). The major cell subsets obtained by manual gating were overlaid on UMAP plots of the  $\beta 2M^-CD51/61^-\alpha 6^+$  (Figure 5A and B). Three cell clusters were mainly delineated (1) a primitive spermatogonial cluster consisting of  $\alpha 6^+SSEA4^+$  and  $\alpha 6^+THY1^+$  populations, with SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> cells at the edge of this cluster, (2) the  $\alpha 6^+KIT^+$  differentiating spermatogonia cluster making a cell state transition, (3) towards the third cluster of more advanced differentiated  $\alpha 6^+SSEA4^-$  spermatogonia. Heatmap overlay of

all the 13 markers on UMAP plot showed a differential expression of CD47, CD155, TSPAN33, THY1, FGFR3, CD7 and SSEA4 markers in the primitive spermatogonia cluster, allowing to discriminate different subpopulations in this cluster, with notably a prominent expression at its left edge (Fig 5C). CD130, CD155 and dim  $\alpha 6$ -integrin expression was noted in the more advanced differentiated spermatogonia  $\alpha 6^+$  SSEA4<sup>-</sup> spermatogonia.

When the 20,646  $\beta 2M^-CD51/61^- \alpha 6^+THY1^+$  were projected on UMAP (Fig 6), we observed two clusters, one comprising SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup>,  $\alpha 6^+CD47^{high}$ , and  $\alpha 6^+CD7^{high}$  cells at the upper part, and one consisting of SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup> cells and  $\alpha 6^+CD155^{med}$  in the lower part (Fig 6A, B and C). Heat maps of the marker expression shows a progressive expression of the CD7 marker ranging from a low to high level when progressing from SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup> cluster to SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> one (Fig 6D and E). SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> cells show the higher expression of CD47, CD155 and CD7 markers and medium expression of CD130 and CD148 (Fig 6D). FGFR3 expression was found in cells at the border of the 2 clusters, suggesting a transition step between the 2 states (Fig 6D). We investigated whether the population we defined could correspond to the state 0 of the spermatogonial hierarchy previously defined in scRNAseq analysis (Guo *et al.*, 2018). In agreement with this, we found that mRNA of *PIWIL4*, *C19orf84*, *PLPPR3* and *UTF1* markers of state 0 and state SSC1-B (Guo *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019b) were highly expressed in SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> cell fractions compared to SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup> cells, that were flow sorted using our initial 8-C panel (Fig. 6F). Hence,  $\beta 2M^-CD51/61^- \alpha 6^+SSEA4^+TSPAN33^+ THY1^+CD155^+ CD148^+CD47^{high}CD7^{high}$  cell population should correspond to the most primitive SSCs state 0 or state SSC1-B, or include these primitive states of SSCs (Guo *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019b).

## DISCUSSION

The understanding of the developmental hierarchy of human SSCs and spermatogonial progenitors has greatly benefited from scRNAq studies, allowing to delineate different cell states in the primitive spermatogonial population (Guo *et al.*, 2018; Hermann *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019b; Shami *et al.*, 2020; Di Persio *et al.*, 2021). However, the functional studies of these putative SSCs subsets are still limited. TSPAN33 and PLPPR3 markers identified in these subsets were recently confirmed to define cell population with a regenerative potential using testicular transplantation assay (Shami *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020). Here, we designed a 14-C panel to generate a comprehensive profiling of human SSCs by spectral flow cytometry. Comprehensive screening of extracellular membrane markers of SSCs, embryonic stem cells, and other kind of tissue stem cells allowed us to identify new markers of SSCs such as CD47, CD7, CD148, CD155. This combination allows to identify a primitive SSCs state with  $\beta$ -2M<sup>-</sup>CD51/61<sup>-</sup> $\alpha$ 6<sup>+</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup>CD148<sup>+</sup>CD47<sup>high</sup>CD7<sup>high</sup> phenotype.

By profiling the SSCs subsets, a hierarchy is suggested in the process of differentiation with a transition from a primitive  $\alpha$ 6<sup>+</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup>CD148<sup>+</sup>CD47<sup>high</sup>CD7<sup>high</sup> state to a  $\alpha$ 6<sup>+</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup>THY1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup>CD148<sup>+</sup>CD47<sup>+</sup>CD7<sup>low/med</sup> state, FGRG3<sup>+</sup> cells being found between the 2 cell clusters suggesting a transition step. Then they differentiate into SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup>THY1<sup>-</sup>CD148<sup>-</sup>CD7<sup>-</sup>KIT<sup>+</sup> differentiating spermatogonial states. The expression of KIT constitutes a cell state transition towards the third cluster of more advanced differentiated  $\alpha$ 6<sup>med</sup> SSEA4<sup>-</sup> spermatogonia.

TSPAN33, SSEA4,  $\alpha$ -6 integrin, THY1, and PLPPR3 are markers of spermatogonial cells with repopulation potential (Izadyar *et al.*, 2011; Shami *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020; Givelet *et al.*, 2022). Of note, we show that  $\beta$ 2M<sup>-</sup>CD51/61<sup>-</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup> cells coexpress THY1 and PLPPR3 stem cell markers. In addition, these TSPAN33<sup>+</sup> SSCs populations express at higher level CD47 compared to the TSPAN33<sup>-</sup> population. CD47 expression was described to be enriched in transcriptome from PLPPR3<sup>+</sup> and from SP $\beta$ 2M<sup>-</sup> $\alpha$ 6<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup> SSCs population that exhibit regenerative potential after transplantation (Tan *et al.*, 2020; Givelet *et al.*, 2022).

CD47 is also a marker of state 0 and state SSC1-B considered to be the most primitive SSCs (Guo *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019b). The co-expression of TSPAN33 and CD47 expression, along with *PIWIL4*, *C19orf84*, *PLPPR3* and *UTF1* in this SSCs subpopulation, representing around 0.13% of the germinal populations, suggest that it corresponds to the primitive primitive state 0 and SSC1-B of SSCs, previously described in scRNAseq studies. Moreover, cells expressing a dim expression of SSEA4 are observed in the population with  $\beta$ -2M<sup>-</sup>CD51/61<sup>-</sup> $\alpha$ 6<sup>+</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup>CD148<sup>+</sup>CD47<sup>high</sup>CD7<sup>high</sup> phenotype, like SSCs from state 0 defined in scRNAseq analysis as TSPAN33<sup>+</sup> SSEA4<sup>low</sup> (Guo *et al.*, 2018).

We show that CD47, CD155, CD148, and CD7 are expressed in the populations of human primitive spermatogonia, questioning about their potential role in SSCs physiology. The main role of the transmembrane protein CD47 seems to protect cells from phagocytosis. CD47 when bound to regulatory protein- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) expressed on macrophages and dendritic cells, inhibits the process of phagocytosis (Willingham *et al.*, 2012). For example, mobilized hematopoietic stem cells protect themselves from phagocytosis by modulating CD47 expression (Jaiswal *et al.*, 2009). As testicular residential macrophages have been described to take place in the niche layered at the basement membrane, higher CD47 expression could be a way to protect SSCs from potential phagocytosis by macrophages. CD155, initially identified as PolioVirus Receptor (PVR), is an immunoglobulin superfamily molecule involved in many different physiological processes mediating intercellular interactions or cell adhesion to extracellular matrix, and cell migration (Molfetta *et al.*, 2020). CD148 (PTPRJ), a receptor-type protein tyrosine phosphatase, has a prominent role in negative regulation of growth factor signals and cell proliferation (Mori *et al.*, 2018; Zhu, 2018). Particularly, it has been reported to modulate FGF receptor (FGFR), Erk1/2, and the the Src family of protein tyrosine kinases (SFKs) (Takahashi *et al.*, 2012), molecular pathways that were shown to be involved in murine SSCs fate regulation (Ishii *et al.*, 2012; Masaki *et al.*, 2018). CD7 is a T-cell associated molecule expressed early in T cell ontogeny and a marker of various cancer stem cells, but the role of CD7 remains unknown.

The development of mass cytometry and spectral cytometry has expanded the ability to define more accurately the cell heterogeneity in complex biological systems enabling to collect on single cells simultaneously a large number of data from cell phenotyping. Here, we

have characterized the dynamic changes in the expression of markers of human SSCs using classical flow and spectral cytometry. The combination of a greater number of biomarkers and computational approaches should help to tackle the shortcomings to the knowledge gap concerning the identification of human primitive spermatogonia, allowing an accurate characterization of the spermatogonial populations and a better hierarchization of the successive SSCs states through analysis of their stem cell potential after transplantation.

## Experimental procedures

### Human materials

Adult human testis biopsies from obstructive azoospermia patients with normal spermatogenesis were obtained from the CECOS Hospital Cochin. All patients consented to inclusion in this research study (IRB-approved protocol: IRB 00003835; 2012/40ICB; French Institutional Review Board-Comité de Protection des Personnes, Ile de France IV).

### Testicular single-cell suspensions, immunomagnetic and flow cell sorting, and analysis

Testicular single-cell suspensions were prepared from human biopsies. The tissue was incubated in trypsin 0.25% containing collagenase I (final concentration, 0.5 mg/ml) for 20 minutes at 34°C. The cell suspension was then filtered (20  $\mu$ m). The mix of antibodies was incubated with *Brilliant Stain Buffer Plus* (BD Biosciences) and cells were preincubated in Human TruStain FcX™ (Biolegend) and True-Stain Monocyte Blocker™ (Biolegend) according to manufacturer instruction. Then cells were incubated with the following antibodies for 20 min at 4°C as previously described (Barroca et al., 2009): anti- $\alpha$ -6 integrin, anti- $\beta$ 2-M, anti-CD148, anti-CD155, anti CD51/61, anti-CD47, anti-CD130, anti-KIT (all from BD Biosciences), anti-TSPAN33, anti-THY1, anti-CD7 (all from Biolegend), anti-SSEA4 (Miltenyi Biotec), anti-FGFR3 (Biotechne). After washing, propidium iodide (Sigma), or Hoechst 33342 (Sima) was added before cell sorting to exclude dead cells. Analysis and cell sorting were performed using a FACSAria cytometer (BD Biosciences), and spectral 5 lasers Aurora cytometer (Cytek). Gate positions were determined using fluorescence minus one (FMO) controls to delineate boundaries separating negative from positive staining. The data were analyzed with DIVA, FlowJo, or SpectoFlo software. UMAP analysis were performed using FlowJo or OMIQ as an unsupervised nonlinear dimensionality reduction method to explore and visualize the multidimensional data generated with the panel were performed on indicated populations based on all parameters (excluding forward scatter, side scatter, and dead cell parameters). Representative analyses are presented.

**RNA extraction and quantitative RT-PCR** mRNA was prepared using RNeasy<sup>®</sup> Micro and Mini kits (Qiagen). The mRNA was then reverse-transcribed with a Quantitect kit (Qiagen). Quantitative RT-PCR was performed using an AB7900 device (Applied Biosystems) with Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems).

### **Statistics**

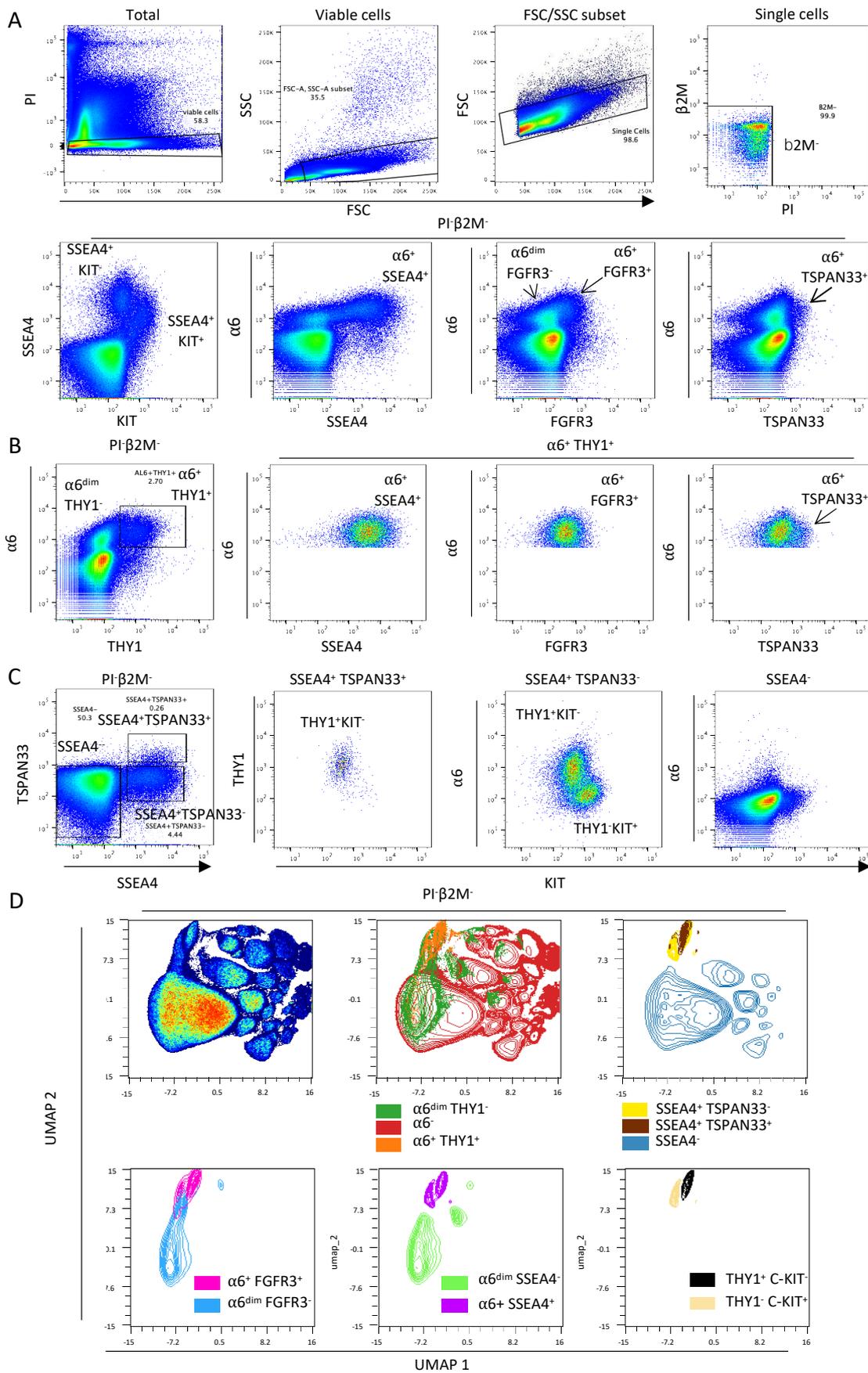
All values are shown as the means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by Student's t test (GraphPad Prism software): ns, not significant,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

## REFERENCES

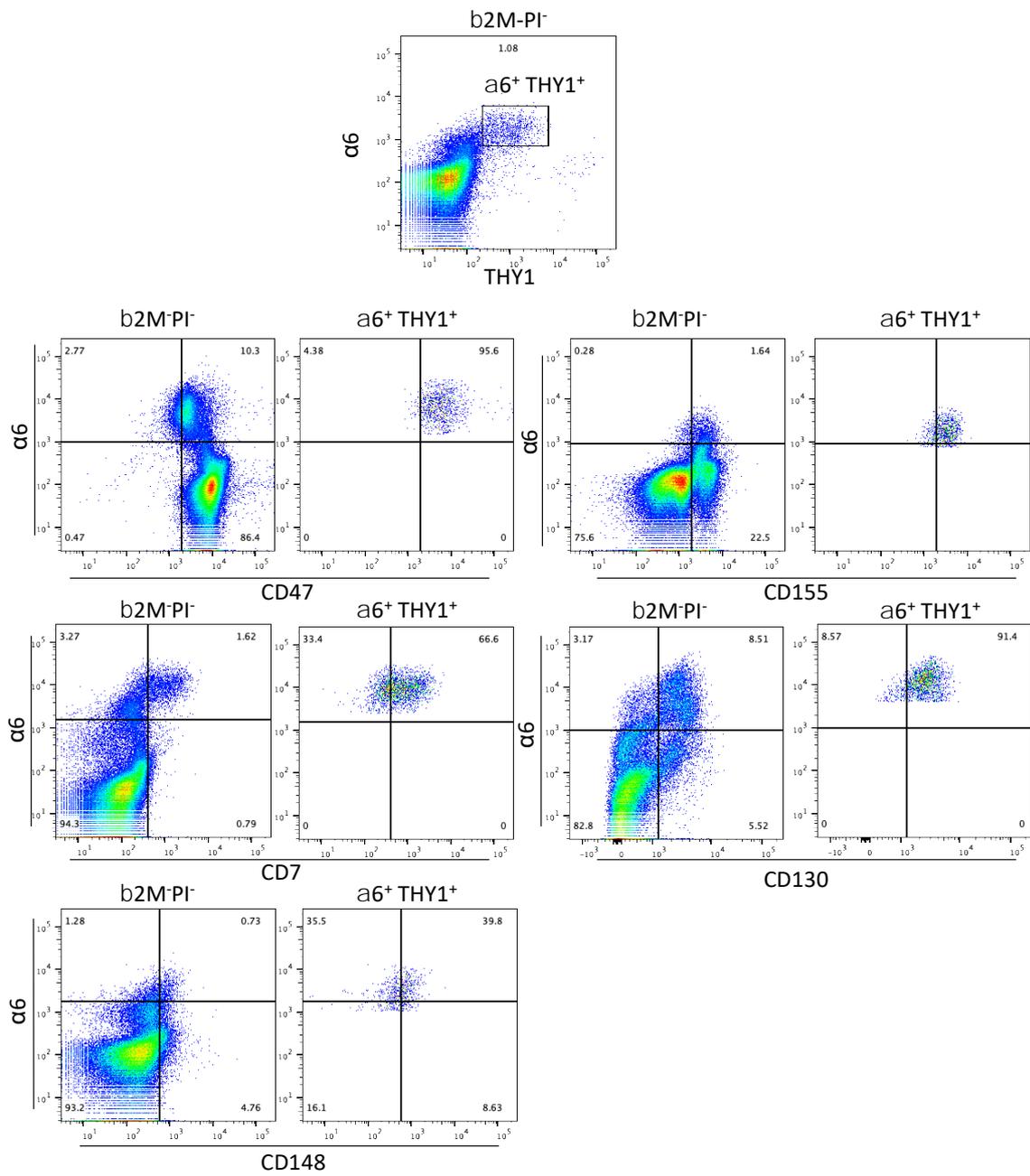
- Chen, P. et al. (2019) 'Characterization and differentiation of CD51+ Stem Leydig cells in adult mouse testes', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 493, p. 110449. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110449>.
- Di Persio, S. et al. (2021) 'Single-cell RNA-seq unravels alterations of the human spermatogonial stem cell compartment in patients with impaired spermatogenesis', *Cell Reports Medicine*, 2(9), p. 100395. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100395>.
- Fayomi, A.P. et al. (2019) 'Autologous Grafting of Cryopreserved Prepubertal Rhesus Testis Produces Sperm and Offspring', *Science (New York, N.Y.)*, 363(6433), pp. 1314–1319. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aav2914>.
- Givelet, M. et al. (2022) 'Transcriptional profiling of  $\beta$ -2M-SP $\alpha$ -6+THY1+ spermatogonial stem cells in human spermatogenesis', *Stem Cell Reports*, 17(4), pp. 936–952. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.02.017>.
- Guo, J. et al. (2018) 'The adult human testis transcriptional cell atlas', *Cell Research*, 28(12), pp. 1141–1157. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0099-2>.
- Hara, K. et al. (2014) 'Mouse Spermatogenic Stem Cells Continually Interconvert between Equipotent Singly Isolated and Syncytial States', *Cell Stem Cell*, 14(5), pp. 658–672. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.019>.
- Hermann, B.P. et al. (2012) 'Spermatogonial stem cell transplantation into Rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm', *Cell stem cell*, 11(5), pp. 715–726. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.017>.
- Hermann, B.P. et al. (2018) 'The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids', *Cell reports*, 25(6), pp. 1650-1667.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.026>.
- Ishii, K. et al. (2012) 'FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation', *Development*, 139(10), pp. 1734–1743. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.076539>.
- Izadyar, F. et al. (2011) 'Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis', *Human Reproduction*, 26(6), pp. 1296–1306. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/der026>.
- Jaiswal, S. et al. (2009) 'CD47 is up-regulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis', *Cell*, 138(2), pp. 271–285. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046>.
- Masaki, K. et al. (2018) 'FGF2 Has Distinct Molecular Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche', *Stem Cell Reports*, 10(6), pp. 1782–1792. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.016>.

- Molfetta, R. et al. (2020) 'CD155: A Multi-Functional Molecule in Tumor Progression', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), p. 922. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21030922>.
- Mori, J. et al. (2018) 'Maintenance of murine platelet homeostasis by the kinase Csk and phosphatase CD148', *Blood*, 131(10), pp. 1122–1144. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-768077>.
- Oatley, J.M. and Brinster, R.L. (2012) 'The germinal stem cell niche unit in mammalian testes', *Physiological reviews*, 92(2), pp. 577–595. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011>.
- de Rooij, D.G. (2017) 'The nature and dynamics of spermatogonial stem cells', *Development (Cambridge, England)*, 144(17), pp. 3022–3030. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.146571>.
- Shami, A.N. et al. (2020) 'Single-cell RNA sequencing of human, macaque, and mouse testes uncovers conserved and divergent features of mammalian spermatogenesis', *Developmental cell*, 54(4), pp. 529–547.e12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.010>.
- Shinohara, T. et al. (2000) 'Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), pp. 8346–8351.
- Sohni, A. et al. (2019) 'The Neonatal and Adult Human Testis Defined at the Single-Cell Level', *Cell Reports*, 26(6), pp. 1501–1517.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.045>.
- Takahashi, K. et al. (2012) 'Thrombospondin-1 acts as a ligand for CD148 tyrosine phosphatase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), pp. 1985–1990. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106171109>.
- Tan, K. et al. (2020) 'Transcriptome profiling reveals signaling conditions dictating human spermatogonia fate in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(30), pp. 17832–17841. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2000362117>.
- Wang, M. et al. (2018) 'Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals Sequential Cell Fate Transition during Human Spermatogenesis', *Cell Stem Cell*, 23(4), pp. 599–614.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.08.007>.
- Willingham, S.B. et al. (2012) 'The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), pp. 6662–6667. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1121623109>.
- Zang, Z.J. et al. (2017) 'Transplantation of CD51+ Stem Leydig Cells: A New Strategy for the Treatment of Testosterone Deficiency', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 35(5), pp. 1222–1232. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.2569>.

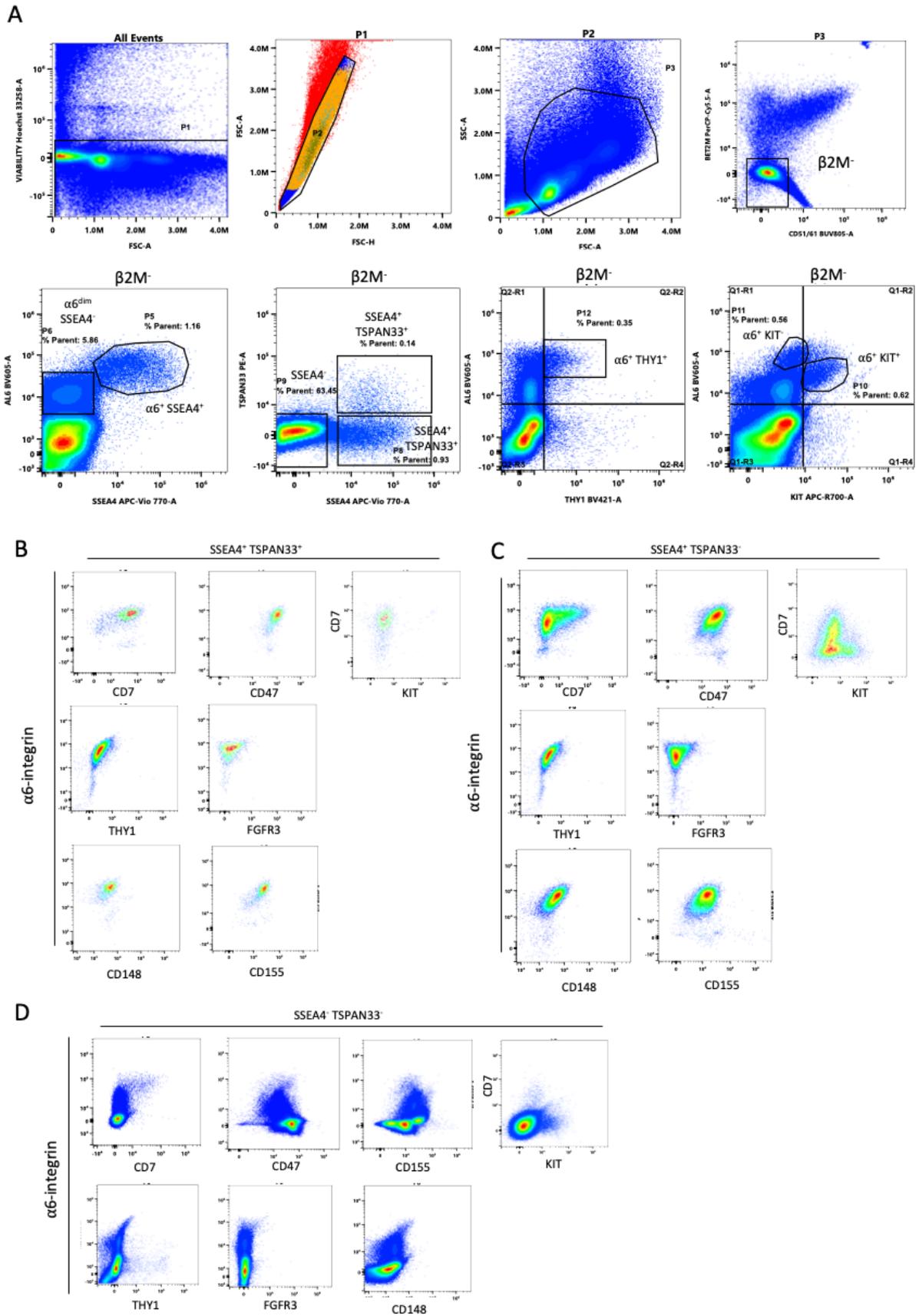
Zhu, J. (2018) 'Csk/CD148 and platelet SFK activation: a balancing act!', *Blood*, 131(10), pp. 1042–1043. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-826438>.



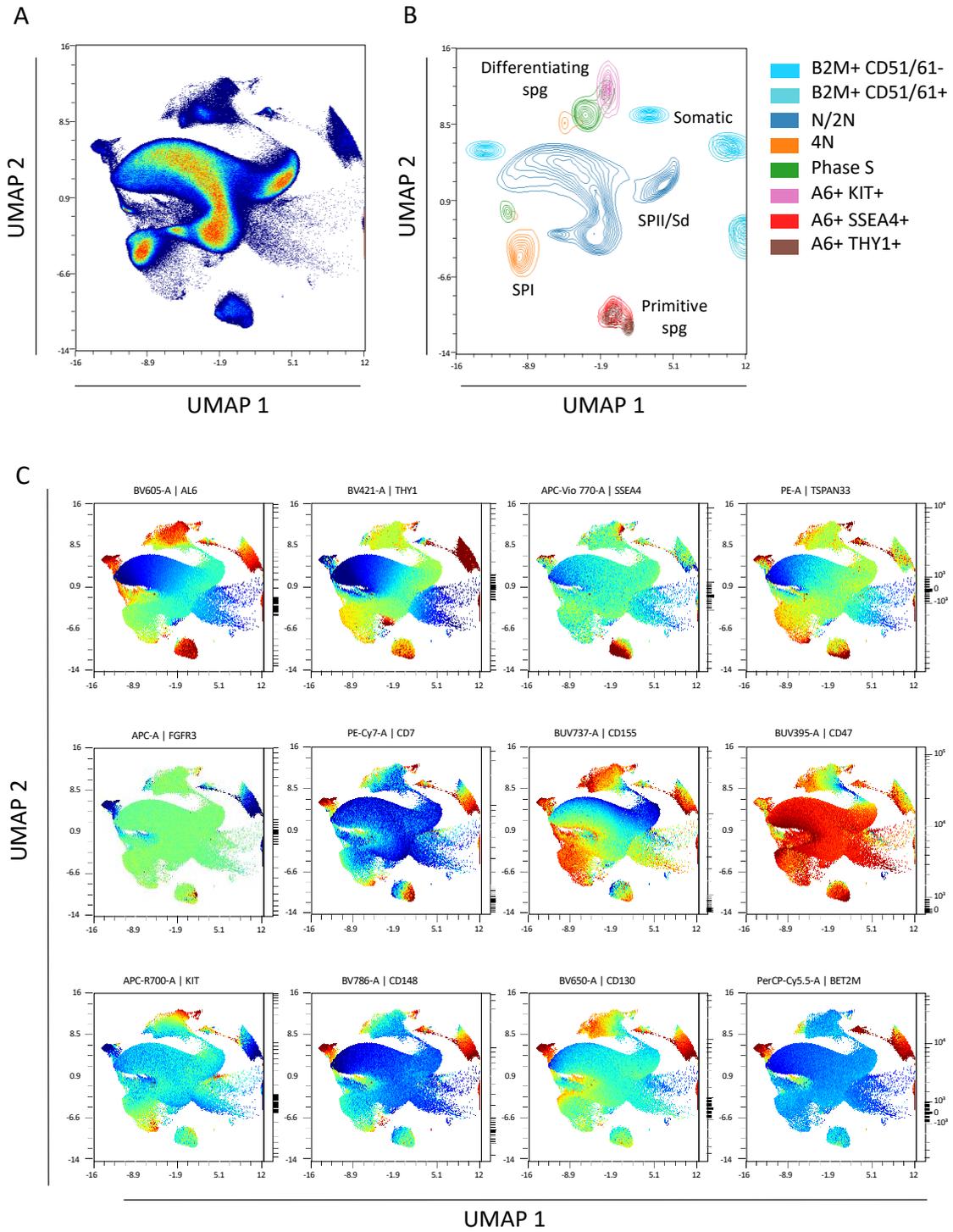
**Figure 1. Characterization of SSCs and spermatogonial progenitors using 8-C fluorescent panel**



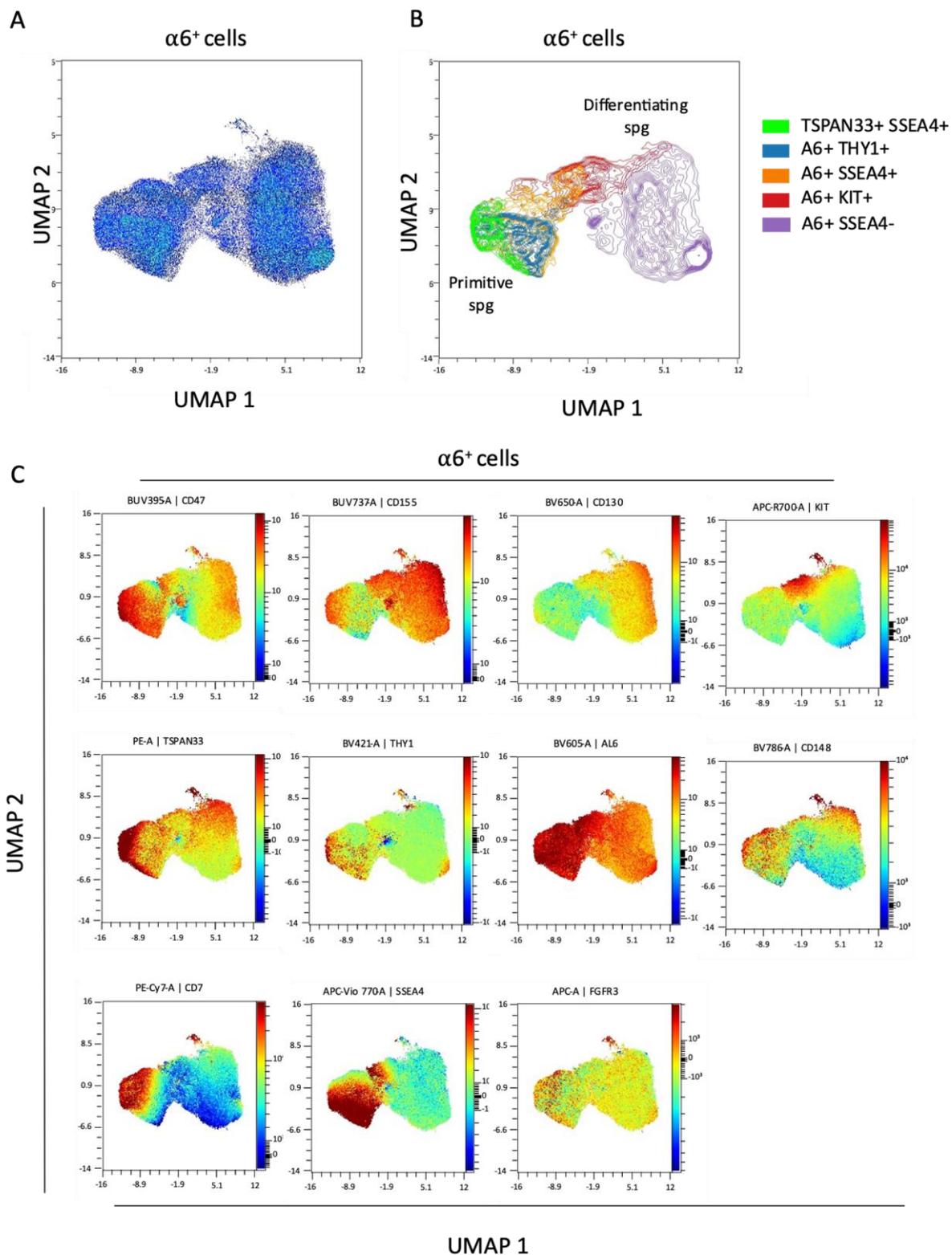
**Figure 2. CD7, CD47, CD155, CD148, and CD130 are new markers of b2M<sup>-</sup>a6<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup> spermatogonia**



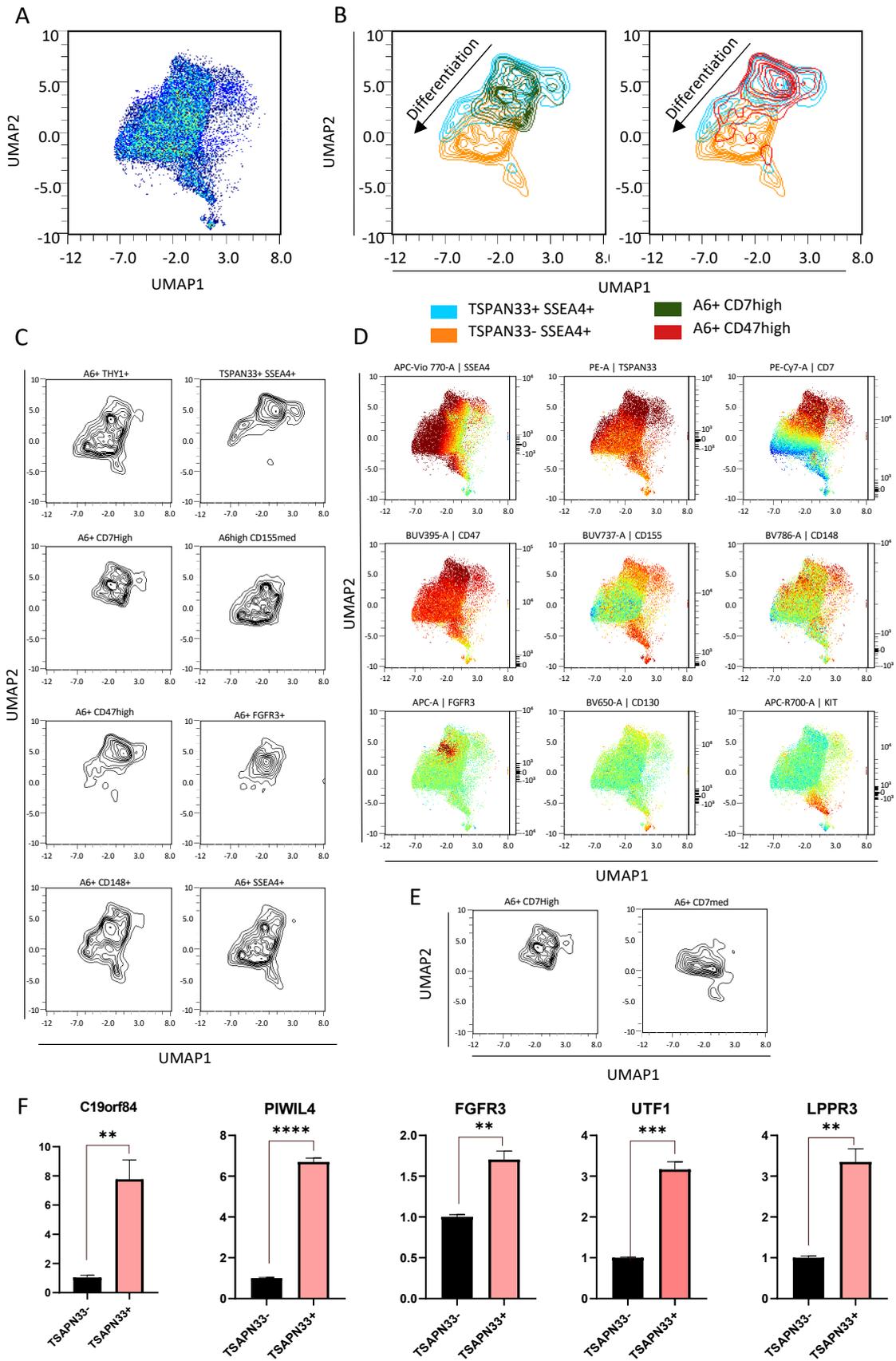
**Figure 3. Flow cytometry profiling of adult testicular cell samples using the 14-C panel.**



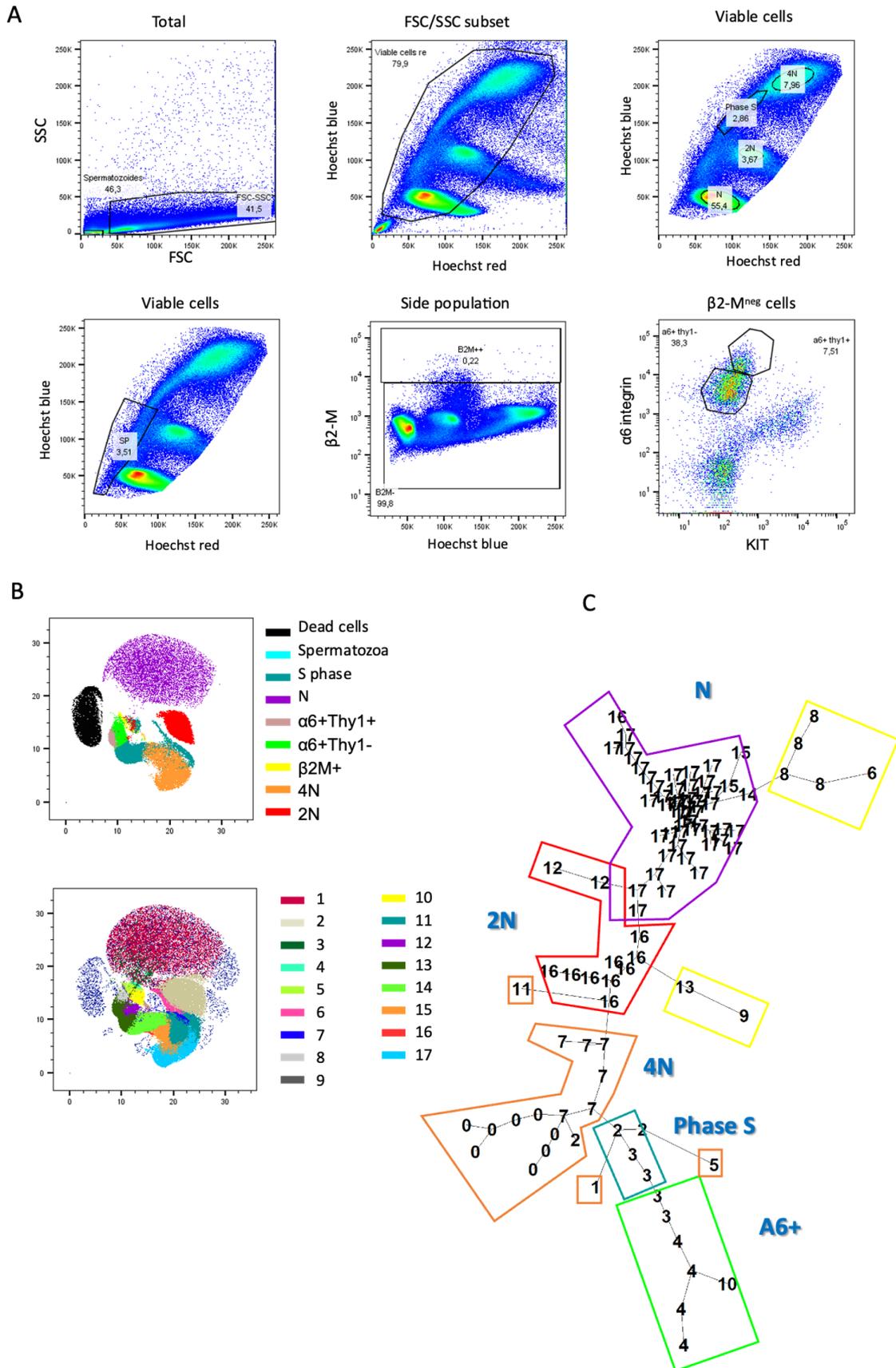
**Figure 4. Comprehensive analysis of multi-dimensional 14-C panel dataset on human testicular cells.**



**Figure 5. Comprehensive analysis of multi-dimensional 14-C panel dataset on  $\alpha 6$  integrin positive spermatogonia.**



**Figure 6. Comprehensive analysis of multi-dimensional 14-C panel dataset on a6<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup> spermatogonial population**



**Fig. S1: Comprehensive analysis of multi-dimensional dataset of a 5 parameters SPβ2Mα6<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup> analysis dataset.**

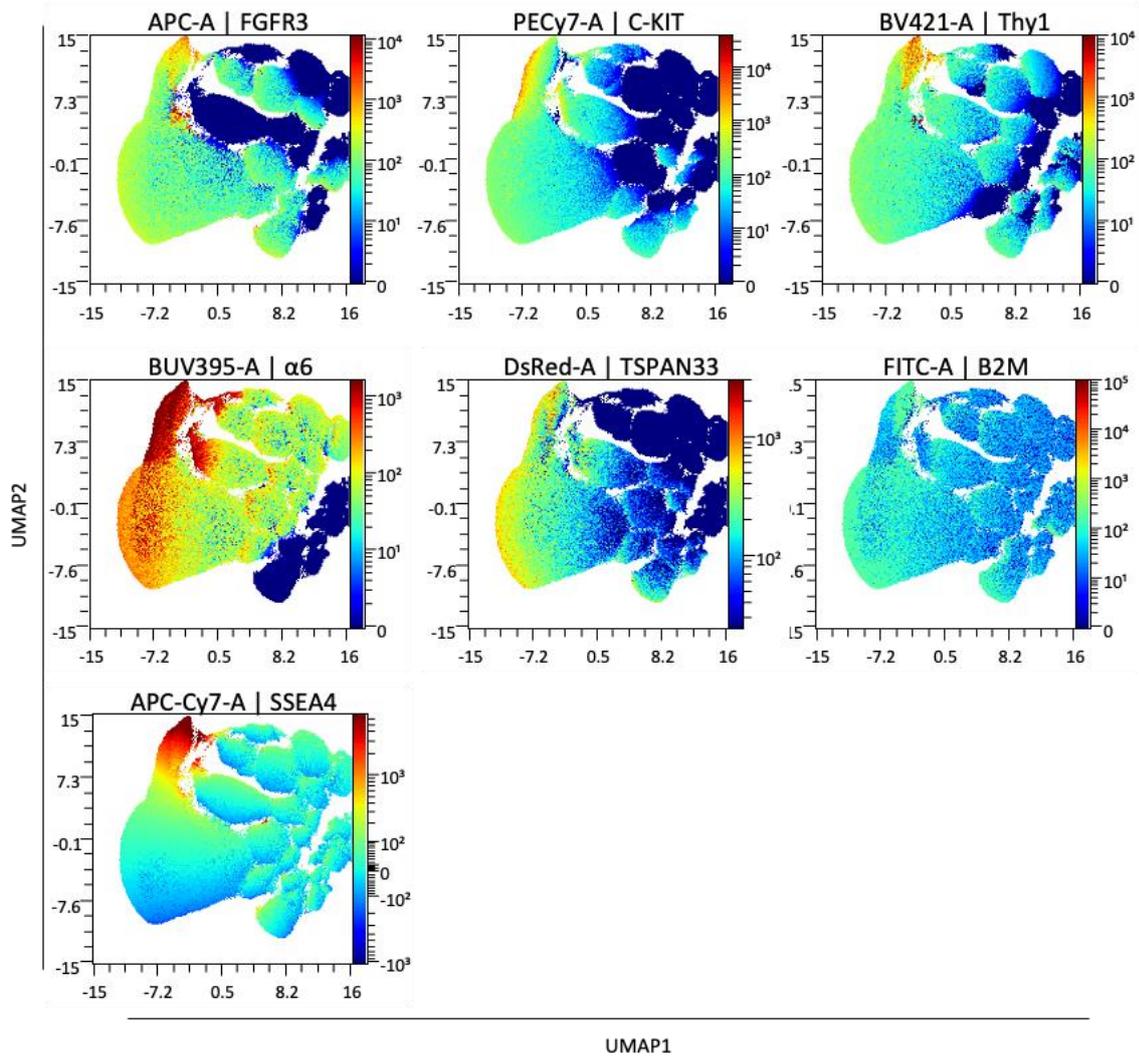


Fig. S2.

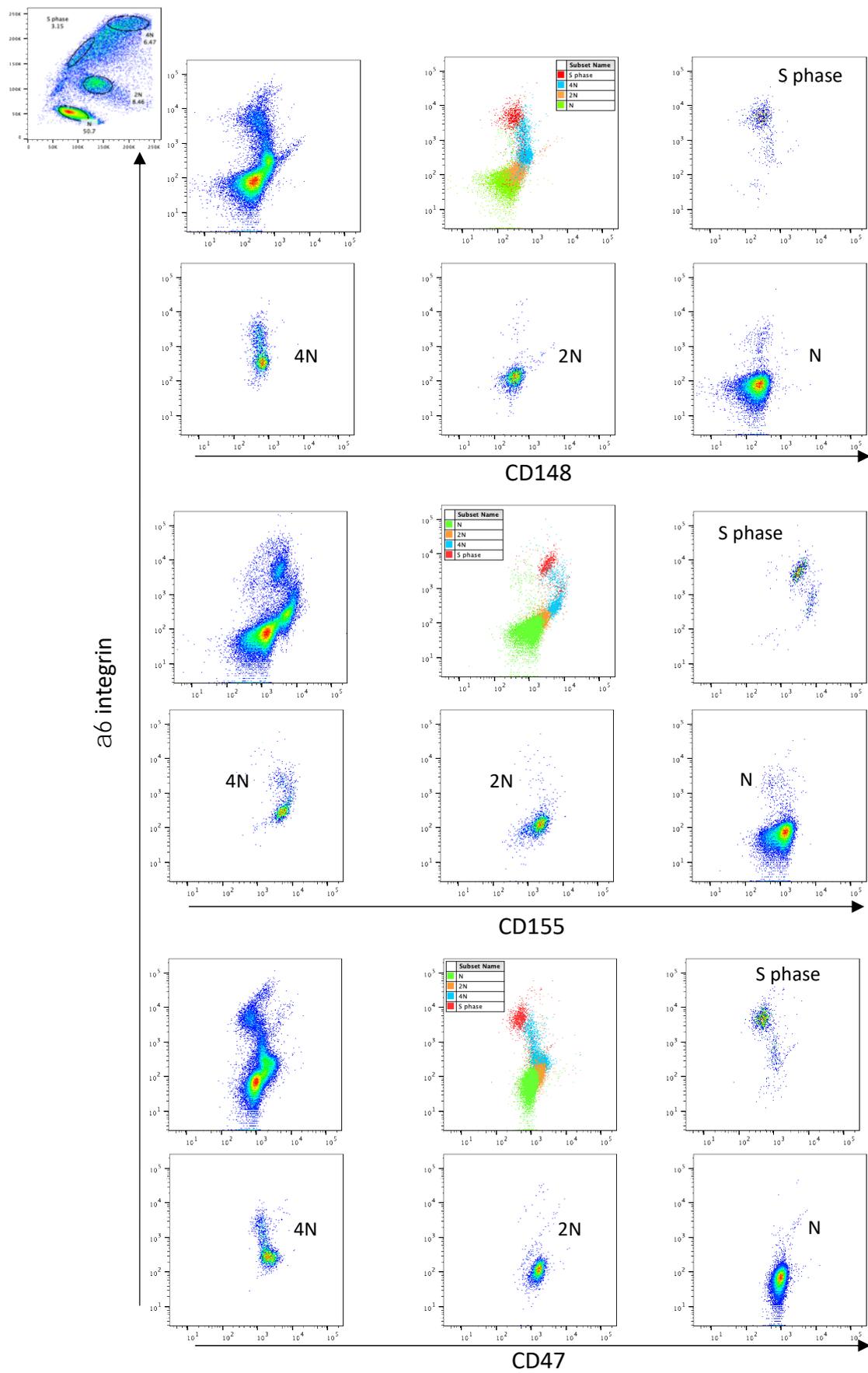


Fig. S3.

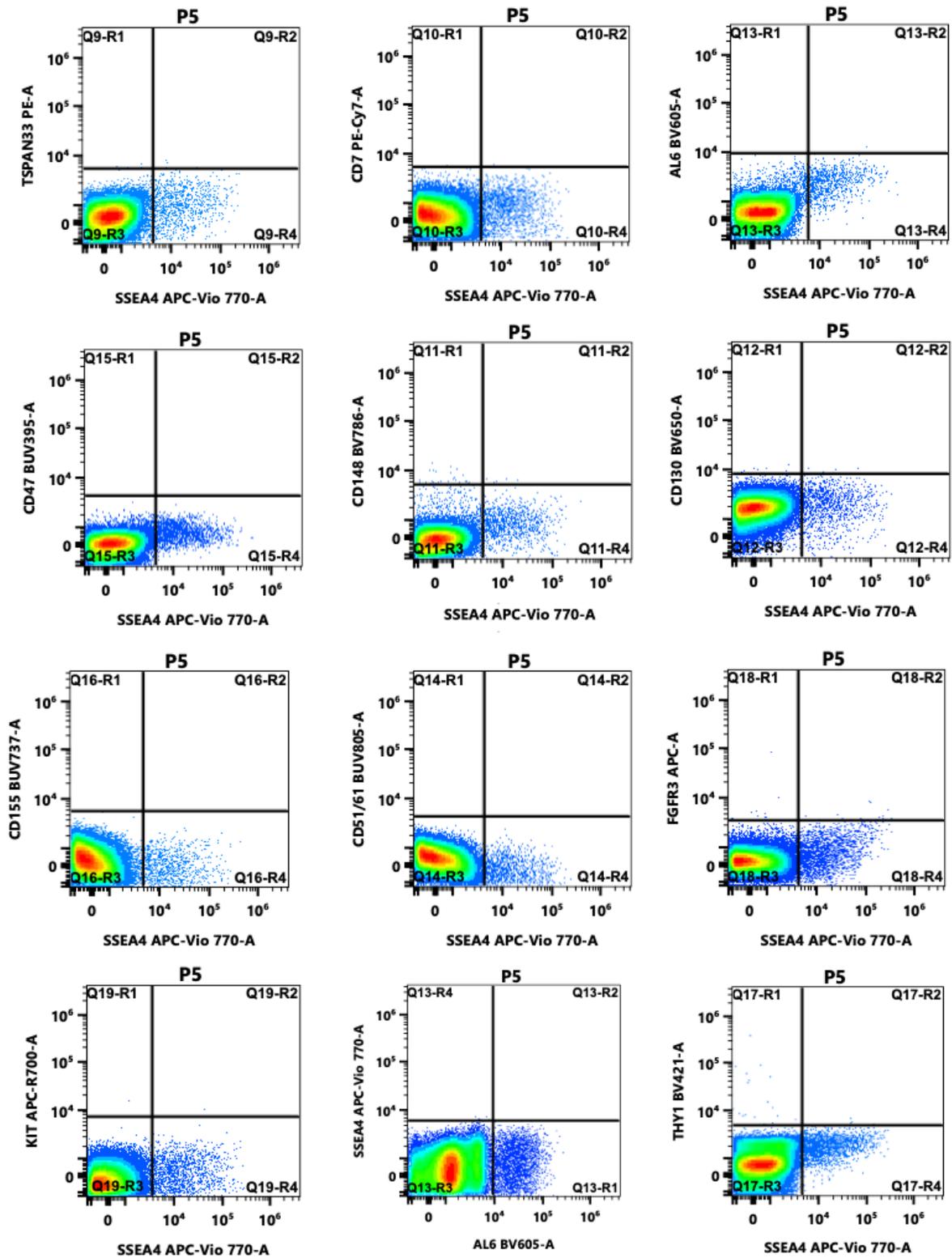


Fig. S4

**Figure 1. Characterization of SSCs and spermatogonial progenitors using 8-C fluorescent panel**

(A) Representative flow cytometry plots of the 8-C panel analysis on the human spermatogonial progenitors according to Forward (FSC) and side scatter (SSC),  $\beta 2 M$ ,  $\alpha 6$  integrin, SSEA4, KIT, THY1, FGFR3, or TSPAN33 parameters. Testicular cells were gated based on morphology to remove cellular debris and doublets. The frequency of the populations is indicated in the graph. (B) SSEA4, FGFR3, or TSPAN33 expression in the  $\beta 2 M^- \alpha 6^+ THY1^+$  population. (C) Flow cytometric cytogram of TSPAN33 and SSEA4 markers in germinal  $\beta 2 M^-$  population, and THY1 and KIT expression in  $SSEA4^+ TSPAN33^+$ ,  $SSEA4^+ TSPAN33^-$ ,  $SSEA4^- TSPAN33^-$  germinal populations. (D) High-dimensional UMAP analysis of human testicular cells segregates the different spermatogonial progenitors. Testicular cell subsets defined in Fig1A, B and C are indicated on the UMAP.

**Figure 2. CD7, CD47, CD130, CD155, and CD148 are new markers of  $\beta 2 M^- \alpha 6^+ THY1^+$  spermatogonia**

Flow cytometric analysis of the Expression of CD7, CD47, CD155, CD148, and CD130 in the whole  $\beta 2 M^-$  germinal population and in the  $\beta 2 M^- \alpha 6^+ THY1^+$  population.

**Figure 3. Flow cytometry profiling of adult testicular cell samples using the 14-C panel.**

(A) Representative flow cytometry plots of the spectral flow analysis on the human spermatogonial progenitors according to FSC, SSC,  $\beta 2 M$ , CD51/CD61,  $\alpha 6$  integrin, THY1, SSEA4, and TSPAN33 parameters. Testicular cells were gated based on morphology to remove cellular debris, sperm and doublets. The frequency of the populations are indicated in the graph. (B,C,D) Expression of CD7, CD155, CD148, CD47, and KIT markers in the  $\beta 2 M/CD51/CD61^- SSEA4^+ TSPAN33^+$  (B),  $\beta 2 M/CD51/CD61^- SSEA4^+ TSPAN33^-$  (C), and  $\beta 2 M/CD51/CD61^- SSEA4^- TSPAN33^-$  (D) germinal populations. Figure S4 shows most relevant fluorescence minus one (FMO) control.

**Figure 4. Comprehensive analysis of multi-dimensional 14-C panel dataset on human testicular cells.**

(A) High-dimensional UMAP analysis of human testicular cells, (B) Testicular cell subsets defined in Fig. 3 are indicated on the UMAP. Spermatoocyte I (SPI), spermatoocyte II (SPII), spermatooids (Sd) (C) Expression patterns of individual spermatogonial markers overlaid onto the UMAP representation of human testicular cells. Color indicates fluorescence intensity of the marker (red: high to blue: neg).

**Figure 5. Comprehensive analysis of multi-dimensional 14-C panel dataset on  $\alpha 6$  integrin positive spermatogonia**

(A) High-dimensional UMAP analysis of human testicular cells, (B) Testicular cell subsets defined in Fig. 3 are indicated on the UMAP. (C) Expression patterns of individual spermatogonial markers overlaid onto the UMAP. Color indicates fluorescence intensity of the marker (red: high to blue: neg).

**Figure 6. Comprehensive analysis of multi-dimensional 14-C panel dataset on  $\alpha 6^+ \text{THY1}^+$  spermatogonial population**

(A) High-dimensional UMAP analysis of  $\beta 2\text{M}/\text{CD}51/\text{CD}61^- \alpha 6^+ \text{THY1}^+$  cells and (B) overlay of  $\text{SSEA}4^+ \text{TSPAN}33^+$ ,  $\text{SSEA}4^+ \text{TSPAN}33^-$ ,  $\alpha 6^+ \text{CD}7^{\text{high}}$  and  $\alpha 6^+ \text{CD}47^{\text{high}}$  populations. (C) Spermatogonial cell subsets defined in Fig. 3 are indicated on the UMAP. (D) Expression patterns of individual spermatogonial markers overlaid onto the UMAP. Color indicates fluorescence intensity of the marker (red: high to blue: neg). (E) Gradient of expression of the CD7 marker in the primitive spermatogonial population  $\beta 2\text{M}/\text{CD}51/\text{CD}61^- \alpha 6^+ \text{THY1}^+$ . (F) Expression of C19orf84, PIWIL4, FGFR3, UTF1 and LPPR3 markers in  $\text{SSEA}4^+ \text{TSPAN}33^+$  and  $\text{SSEA}4^+ \text{TSPAN}33^-$  populations sorted by flow cytometry based on the 8C-panel.

**Fig. S1: Comprehensive analysis of multi-dimensional dataset of a 5 parameters SP $\beta$ 2M $\alpha$ 6<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup> analysis dataset.**

(A) Representative flow cytometry plots of the human testicular according to Forward (FSC) and side scatter (SSC),  $\beta$ 2 microglobulin,  $\alpha$ 6 integrin, THY1, and hoechst 33342 fluorescence. Testicular cells were gated based on morphology to remove cellular debris and doublets. (B) UMAP representations of testicular SP $\beta$ 2M $\alpha$ 6<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup> analysis dataset : (upper) testicular cell subsets defined in Fig. S1A are indicated on the UMAP, (lower) FlowSOM computational clustering fitted to major testicular subsets previously defined (C) Generation of a reference minimal spanning tree consisting of the 17 clusters defined by FlowSOM.

**Fig. S2.** Expression patterns of individual spermatogonial markers overlaid onto the UMAP representation of human testicular cells of Fig. 1D. Color indicates fluorescence intensity.

**Fig. S3.** Assignment of meiotic and post meiotic populations according to the expression of CD148, CD155, and C47. Late differentiating spermatogonia  $\beta$ -2M $\alpha$ -6<sup>med</sup>Thy-1<sup>-</sup> “S-phase” (“S-phase”), spermatocyte (4N), spermatocyte II (2N), and spermatids (N) germinal populations were defined according to their DNA content (Hoechst 33342 fluorescence).

**Fig. S4.** Fluorescence minus one (FMO) control for the flow cytometry profiling of adult testicular cell samples using the 14-C panel



## II) Etude du rôle de la méthyltransférase DOT1L dans l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches germinales

### Contexte et objectif de l'étude :

La chromatine est constamment remodelée au cours du développement et de la différenciation cellulaire. Les modifications épigénétiques de la chromatine autorisent une certaine plasticité cellulaire afin que les cellules s'adaptent à leur microenvironnement et conservent les informations sans modification de la séquence d'ADN. Ainsi, l'apposition très dynamique des marques épigénétiques est impliquée dans les transitions entre différents états cellulaires, notamment au cours du développement et de la balance entre autorenouvellement et différenciation des cellules souches. Des travaux récents suggèrent un rôle important des modificateurs de la chromatine dans l'homéostasie des cellules souches germinales (Mu *et al.*, 2014; Tomizawa *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2020; Dura *et al.*, 2022).

Nous avons récemment caractérisé les CSGs humaines dans la population SP $\alpha$ 6<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup> $\beta$ -2M<sup>-</sup> (Givelet *et al.*, 2022). Nous avons montré que MLLT3/AF9 est le facteur de régulation transcriptionnelle le plus exprimé dans cette population. AF9 joue un rôle dans la régulation épigénétique et la transcription. AF9 reconnaît la marque épigénétique H3K9ac via son domaine YEATS, et recrute la méthyltransférase DOT1L pour apposer la marque H3K79me2/me3 qui est une marque d'activation de la transcription. AF9 et DOT1L coopèrent ainsi et interviennent dans la régulation épigénétique et la transcription. AF9 est également un partenaire du Super Elongation Complex (SEC) qui régule la transcription (Li *et al.*, 2014).

L'avènement de thérapies ciblées en combinaison ou non avec des chimiothérapies conventionnelles semble prometteuse pour le traitement des cancers. Parmi celles-ci se trouvent les thérapies ciblant des enzymes intervenant dans la régulation épigénétique, comme les méthyltransférases. Dans les leucémies lymphoblastoïdes et myéloïdes aigues avec un réarrangement impliquant *MLL* (*mixed-lineage leukemia*), l'implication d'AF9, un des partenaires de fusion de *MLL*, et de la méthyl transférase DOT1L a été montrée. Ainsi, DOT1L est une cible thérapeutique potentielle dans ces leucémies (Bernt *et al.*, 2011; Daigle *et al.*,

2011), ainsi que le domaine YEATS des partenaires des réarrangements tels que AF9 et ENL (Erb *et al.*, 2017; Wan *et al.*, 2017) L'inhibition de DOT1L combinée à des agents chimiothérapeutiques endommageant l'ADN, est considérée comme une approche prometteuse afin d'améliorer les traitements des leucémies avec un réarrangement MLL (19). Le développement potentiel de ces thérapies ciblant l'activité enzymatique de DOT1L interroge sur les conséquences de tels traitement sur la fertilité des patients prépubères atteints de leucémies MLL. Le rôle de DOT1L dans le développement du lignage germinale reste peu connu, et notamment aucune donnée n'est disponible sur les conséquences d'une altération de la fonctionnalité de ce gène sur le potentiel des CSGs.

Dans ce travail collaboratif avec l'équipe de Julie Coquet (Institut Cochin), j'ai étudié le rôle du gène *Dot1l*, dans la différenciation des cellules germinales dans un modèle de souris KO conditionnel *Stra8-Cre;Dot1l<sup>flox/flox</sup>*, désigné par la suite DOT1L KO, dans lequel l'exon 2 du gène *Dot1l* est délété dans la lignée germinale mâle grâce à l'expression du transgène *Stra8-Cre* (Sadate-Ngatchou *et al.*, 2008). Tout d'abord, l'équipe de Julie Cocquet a montré dans un travail auquel j'ai collaboré que l'inactivation conditionnelle du gène *Dot1l* dans les cellules germinales affecte la spermatogenèse au niveau de la spermiogenèse, et la fertilité chez la souris (Blanco *et al.*, 2022). Pour mon travail de thèse, je me suis plus particulièrement focalisé sur le rôle du gène *Dot1l* dans la régulation du destin cellulaire des CSGs dans ce modèle de souris KO. Nous observons notamment une diminution du pool de cellules souches germinales, un déficit fonctionnel de ces cellules, et un défaut de différenciation dans le pool de spermatogonies indifférenciées. Nos résultats suggèrent un rôle potentiel de *Dot1l* dans la régulation de la maintenance des CSGs et de la réponse aux dommages à l'ADN. Chez les souris *Dot1l* KO, nous observons un profil de différenciation des spermatogonies indifférenciées proches de celui des souris sauvages de plus d'un an, évoquant un vieillissement prématuré du pool de progéniteurs immatures chez les souris KO âgées de 3 mois. Chez les souris KO de plus d'un an, une accumulation anormale des spermatogonies indifférenciées est détectée, soulignant un problème de différenciation lié au vieillissement. Les résultats de ce travail, sont présentés sous forme d'un article. Des expériences sont encore en cours et ces données seront intégrées dans le manuscrit par la suite (manuscrit ci-après).





**DOT1L methyltransferase regulates the fate of spermatogonial stem cells and the homeostasis of adult undifferentiated spermatogonia**

Clémentine Lapoujade<sup>1,2,3</sup>, Maëlle Givelet<sup>1,2,3,4</sup>, Lydia Riou<sup>1,2,3</sup>, Mélina Blanco<sup>3,4</sup>, Isabelle Allemand<sup>1,2,3</sup>, Anne-Sophie Gille<sup>1,2,3,4</sup>, Manon Coulée<sup>3,4</sup>, Laila El Khattabi<sup>3,4</sup>, Clara Gobé<sup>3,4</sup>, Yuki Okada<sup>5</sup>, Julie Cocquet<sup>3,4</sup>, Pierre Fouchet<sup>1,2,3</sup>

(1) UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, CEA Fontenay aux roses, France.

(2) Université Paris Saclay, Orsay, France.

(3) Université de Paris, Paris, France.

(4) INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France.

(5) Laboratory of Pathology and Development, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

## Abstract

Spermatogenesis originates from a small pool of spermatogonial stem cells (SSCs). SSCs can self-renew to maintain the integrity of the stem cell pool or differentiate to produce spermatozoa. Chromatin modifiers become increasingly involved in SSCs homeostasis, epigenetic modifications being critical regulators of transcription and maintenance of cell identity. The deficiency for the *Dot1l* gene, coding for the unique H3K79 methyltransferase, affects spermatogenesis and fertility in mice. Here, we observe several defects in the undifferentiated spermatogonia population following postnatal deletion of *Dot1l* in germ cells, as an attrition of the  $GFR\alpha1^+$  SSCs pool, and a problem of differentiation from  $GFR\alpha1^+PLVAP^-$  SSCs to  $GFR\alpha1^-$  undifferentiated spermatogonia. This bias of differentiation was also found in old normal mice and could suggest a potential premature aging of the pool of undifferentiated spermatogonia in *Dot1l*-knockout (KO) mice. The KO SSCs show also a reduced capacity to form colony *in vitro* and *in vivo* a defect in their regenerative potential after testicular transplantation. The phenotype of KO mice worsened with aging, and the accumulation of undifferentiated spermatogonia was observed in testis of aged KO DOT1L mice, evoking a potential skipping of the amplification step of the differentiating spermatogonial population. KO SSCs show also *in vitro* an increased sensitivity to genotoxic stress, with an impairment of the G1/S checkpoint. Our results underline the role of the epigenetic modulator *Dot1l* as a major player governing the cell fate of SSCs and progenitors in the undifferentiated spermatogonial population.

## INTRODUCTION

Spermatogenesis arises from the spermatogonial stem cells (SSCs) pool from puberty onwards, leading to the production of spermatozoa in testis. Stem cells are responsible for the homeostasis of tissue in continuous renewal, but also regeneration after tissue damage. They multiply either to self-renew and maintain their stock, or to enter into differentiation and give spermatogonial progenitors that will undergo meiosis to lead to the formation of spermatozoa. The functional activity of SSCs is demonstrated in different species by the regeneration of spermatogenesis after transplantation of these cells into germ cell depleted testes (Brinster and Avarbock, 1994; Hermann *et al.*, 2012). The attrition of the pool of SSCs can lead to fertility issues, from hypofertility to the Sertoli-only-cell syndrome.

In mice, the best characterized mammalian model, approximately 3000 to 4000 SSCs (also called  $A_{\text{single}}$  ( $A_s$ ) spermatogonia) are found in the adult testis. This model is hierarchical and  $A_s$  give rise to successive chains of undifferentiated spermatogonia. Lineage tracing experiments using transgenic mice models to track various markers such as *Id4*, *Pax7*, *Bmi-1*, or *Gfra1* showed the presence of mouse SSC in single  $A_s$  or short chains of spermatogonia (Aloisio *et al.*, 2014; Hara *et al.*, 2014; Komai *et al.*, 2014; Hessel *et al.*, 2017). Furthermore, we and others have identified some combinations of functional or cell surface phenotypic markers, making it possible to purify highly enriched fractions of SSC, and it has been confirmed using transplantation assays that the regenerative potential of SSCs is found in the undifferentiated spermatogonial population (Shinohara, Avarbock and Brinster, 1999; Barroca *et al.*, 2009a; Garbuzov *et al.*, 2018; Nakagawa *et al.*, 2021). This model has been refined by introducing a new hierarchy in the  $A_s$  stem cell population based on the expression of the gene *Id4*. However, this model has been questioned, and Hara *et al.* introduced a new and attractive model for a stochastic regulation of SSCs that considers that spermatogonia expressing the receptor  $\text{GFR}\alpha 1$  constitute an equipotent stem cell population in term of regenerative potential, regardless of their  $A_s$  or syncytial unit status (Hara *et al.*, 2014). Recently, a hierarchical process was described in the  $\text{GFR}\alpha 1^+$  population with a renewal-biased  $\text{PLVAP}^+\text{GFR}\alpha 1^+$  state and a differentiation-primed  $\text{SOX3}^+\text{GFR}\alpha 1^+$  state, although cells could stochastically experience interconversion between these different states (Nakagawa *et al.*, 2021).

Epigenetic modification is an important mechanism for the regulation of transcription and maintenance of cell identity with cell division. Emerging data suggest that chromatin modifiers should play an important role in SSCs homeostasis (Mu *et al.*, 2014; Tomizawa *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2020; Dura *et al.*, 2022). DOT1L, the only identified histone 3 lysine 79 (H3K79) methyltransferase, is involved in embryonic development and stem cell fate regulation, such as fetal and adult hematopoietic stem cells, but also in the emergence of mixed-lineage leukemias (MLL) (Kim, Choi and Kim, 2014; McLean, Karemaker and van Leeuwen, 2014; Sarno, Nebbioso and Altucci, 2019). DOT1L is important for cellular processes including cell cycle progression, DNA damage repair, and transcriptional regulation (Kim, Choi and Kim, 2014; Wood, Tellier and Murphy, 2018). The prospect of targeting DOT1L methyltransferase to treat leukemias with a rearrangement involving MLL, in particular, highlights the importance of evaluating the consequences of such treatments on fertility. DOT1L appears dispensable for oogenesis in mice (Liao and Szabó, 2020) and its role during spermatogenesis remains poorly understood. Here, we observe in a postnatal conditional model of knockout (KO) *Dot1l* mice a decrease in the pool of SSCs, a functional defect of these cells, and a differentiation defect in the pool of undifferentiated spermatogonia, suggesting a premature ageing of the immature progenitor pool. Our data in old KO mice (>one year) underline also a differentiation problem of undifferentiated spermatogonia, with an abnormal accumulation of these cells. Our data highlight the role of epigenetic modulators as a major player in stem cell decisions governing their cell fate and in the homeostasis and the differentiation of the undifferentiated spermatogonia.

## RESULTS

### Undifferentiated spermatogonial population is affected in adulthood after DOT1L postnatal deletion

To investigate the role of *Dot1l* in postnatal male germ cells we generated a conditional KO mice using *Stra8-Cre* recombinase mice (Sadate-Ngatchou *et al.*, 2008) and a mouse transgenic line in which *Dot1l* exon 2 is flanked by *LoxP* sites (Jo *et al.*, 2011) (Fig. 1A). The germline specific *Stra8-Cre* starts to be expressed in prospermatogonia from postnatal day 3, with an higher efficiency when just one allele has to be cut (Sadate-Ngatchou *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 2013). To estimate in our model the efficiency of *Cre* recombinase on the adult spermatogonial pool, we generated a *Stra8-Cre; R26-stop-EYFP* mutant mice (Fig. S1A, B and C). We observed that more than 96 % of adult germinal cells were YFP<sup>+</sup>, and that undifferentiated spermatogonia were nearly all YFP<sup>+</sup> (YFP<sup>+</sup> cells:  $97.7 \pm 0.5\%$ , n=5 testis), as well as the GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>PLVAP<sup>+</sup> subpopulation of SSCs (YFP<sup>+</sup> cells:  $95.2 \pm 1.7\%$ , n=5 testis) (Nakagawa *et al.*, 2021). On the contrary, bone marrow cells and testicular somatic cells were YFP<sup>-</sup> in these mice (Fig. S1C). Hence, *Stra8-Cre* expression in prospermatogonia of postnatal mice, founders of the future pool of adult SSCs, results in high efficiency of excision of at least one allele in the adult SSCs pool. In KO (*Dot1l*<sup>F1/ $\Delta$</sup> ; *Stra8-Cre*) mice, the efficiency of excision of the exon 2 of *Dot1l* was checked by genotyping sorted spermatogonial KIT<sup>+</sup> cells from KO (*Dot1l*<sup>F1/ $\Delta$</sup> ; *Stra8-Cre*) and controls (CTRL - *Dot1l*<sup>F1/F1</sup>) mice (Fig. 1B), showing high efficiency. Genotyping of SSCs culture established from sorted KIT<sup>-</sup> spermatogonia confirmed the excision of the exon 2 (Fig. 1C). In our conditional KO mice, DOT1L protein reduction was already detected by western blot on KO and controls adult testes (Blanco *et al.*, 2022). The strong reduction of DOT1L and the loss of H3K79me2 were also observed on SSCs culture from KO (Fig. 1D), even if residual DOT1L protein was noted.

Recently, we have shown that DOT1L deficiency leads to severe problems of male fertility, affecting the testis weight, the production of functional spermatozoa and their fertilizing abilities (Blanco *et al.*, 2022). Postnatal ablation of *Dot1L* resulted in a roughly 2-fold decrease of the number of the whole germinal population, in agreement with a reduced testis weight,

and the occurrence of SCO-like tubules (Fig. 1E and F). To study the impact of *Dot1L* ablation on the development of spermatogonial populations in the testis, we determined the frequency and the cellularity of the specific developmental subsets in the KO and CTRL mice. The frequency of each stage of differentiation was not altered (Fig. 1G, Table S1), showing no specific arrest of spermatogenesis, but an overall decay of the number of all germinal stages was observed (Blanco *et al.*, 2022). Specifically, this reduction appeared to be caused primarily by an early loss in the spermatogenic process as the reduction was observed in the spermatogonial progenitor populations, and notably in the  $\alpha6KIT^+$  differentiating and  $\alpha6KIT^-$  undifferentiated spermatogonial population (Fig. 1H).

### **DOT1L deficiency affects GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> SSCs pool in adult**

We further characterized the undifferentiated spermatogonial population by microscopic analysis of seminiferous tubules after clearing of testicular tissue. We noted the presence of tubules lacking PLZF<sup>+</sup> or GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> cells in the KO testis, corresponding to SCO. Particularly, we observe a decrease of the number of GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> spermatogonia, a subpopulation of PLZF<sup>+</sup> undifferentiated spermatogonia considered to possess stem potential, which suggest a defect of SSCs in KO mice (Fig. 2A, B and C). Recently, different SSCs subpopulations were discriminated in the undifferentiated spermatogonial population using GFR $\alpha$ 1 and PLVAP markers, with a renewal-biased GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> PLVAP<sup>+</sup> state and a differentiation-primed GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> PLVAP<sup>-</sup> state (Nakagawa *et al.*, 2021). We observed a roughly stable proportion of GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>PLVAP<sup>+</sup> stem cells in the undifferentiated population and a diminution of the frequency of the GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> subpopulation (Fig. 2D), in line with an increase of the GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>PLVAP<sup>-</sup> cells, revealing a default in the transition from GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> to GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> cells in KO mice, corresponding to the commitment from GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> to NGN3<sup>+</sup> undifferentiated spermatogonia (Hara *et al.*, 2014; Nakagawa *et al.*, 2021). Altogether, these data show an attrition of the SSCs pool following postnatal deletion of *Dot1l*, and a problem of differentiation from GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> to GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> (i.e. NGN3<sup>+</sup>) undifferentiated spermatogonia.

### **DOT1L deficiency alters *in vitro* and *in vivo* SSCs functionality**

First, the ability of adult KO SSCs from *Dot1l<sup>Fl/Δ</sup>; Stra8-Cre* mice to form germ cell colonies *in vitro* was tested.  $\beta 2^{-}\alpha 6^{+}$ c-Kit<sup>-</sup>undifferentiated spermatogonia from KO and CTRL mice were sorted by flow cytometry and seeded at low cell density on inactivated MEF-feeder. The colony-forming activity was reduced 2-fold in KO cells (Fig. 3A), showing a functional defect but not an inability to form colonies. We next attempted to establish *in vitro* culture of SSCs from adult *Dot1l<sup>Fl/Δ</sup>; Stra8-Cre* mice by seeding at high cell density, even if the ability to culture *DOT1L-deficient* SSCs could be counterintuitive. We succeeded in establishing some adult KO SSCs culture, but functional testing of KO adult SSCs from >2-months culture revealed again a diminished ability to form germ cell colony at low cell density (Fig. 3B). Likewise, the treatment of adult WT SSCs culture with the DOT1L inhibitor SGC reduced the level of H2K79me2 and their *in vitro* functionality (Fig. 3C). To confirm the default of functionality of KO SSCs, we tested their ability to repopulate recipient depleted testis (Brinster and Zimmermann, 1994; Barroca *et al.*, 2009a). Culture of KO and CTRL SSCs were transduced with a lentivirus expressing GFP. GFP<sup>+</sup> SSCs were sorted, amplified and then were transplanted in recipient depleted testis. Transplanted SSCs from CTRL produced complete spermatogenesis 2 months post-transplant (Fig. 3D and E). Numbers of GFP<sup>+</sup> colonies were scored, and stem cell activity was significantly diminished in the KO population compared to CTRL cells (Fig. 3F), revealing a functional default to regenerate spermatogenesis *in vivo* after KO SSCs transplantation.

### **Aging of KO mice reveals accumulation of the undifferentiated spermatogonia**

First, undifferentiated spermatogonial population was studied in aged control mice (>1 year) and compared to young mice (2-4 months). We noted a decay of the proportion of KIT<sup>-</sup>undifferentiated spermatogonia in aged compared to young testis ( $0.4 \pm 0.06$  % vs  $0.7 \pm 0.03$  % respectively). When this population was further characterized using GFR $\alpha 1$  and PLVAP markers (Fig. 1A), we observed a roughly stable proportion of GFR $\alpha 1^{+}$ PLVAP<sup>+</sup> stem cells, a diminution of the frequency of the GFR $\alpha 1^{-}$  subpopulation, in line with an increase of the GFR $\alpha 1^{+}$ PLVAP<sup>+</sup> cells, revealing a default in the transition from GFR $\alpha 1^{+}$  to GFR $\alpha 1^{-}$  cells (corresponding to NGN3<sup>+</sup> cells) in the undifferentiated spermatogonial population with aging.

Hence, aging seems to affect the pool of undifferentiated spermatogonia and a bias occurs in the sequence of events in the differentiation process of this population. When the proportions of the different subpopulations of undifferentiated spermatogonia were compared between young CTRL, aged CTRL mice and young KO (Fig. 1A), a strikingly similarity was observed between young KO and aged CTRL mice profiles compared to young CTRL mice. Indeed, KO mice recapitulates the phenotype of aging of the undifferentiated spermatogonial pool: a decay of the proportion of  $GFR\alpha1^-$  cells along with an increase of  $GFR\alpha1^+PLVAP^+$ , and no changes in frequency of the most primitive  $GFR\alpha1^+PLVAP^+$  cells. Hence, the bias of differentiation observed in the undifferentiated population with aging was also found in young KO mice. Those data suggest that premature aging affects the differentiation of the undifferentiated spermatogonial pool in young KO mice.

In old *Do1tl*-deficient mice, we first noticed a worsening of their phenotype, namely a decrease of the number of germinal cells, the number of spermatids, the motility and the retention of histone H3 in epididymal spermatozoa in old KO testis (Fig. S2A, B, C, and D). Strikingly, the proportion of  $KIT^-$  undifferentiated spermatogonia was markedly increased compared to aged and young CTRL (Fig. 4B), a phenotype that was not observed in adult young KO mice. In line with this increased representativity of  $KIT^-$  population, the difference in the number of  $KIT^-$  cells was no more significant in aged KO testis (Fig. 4C), in spite of the decreased number of total germinal cells cell that were observed. Besides, the diminution of the frequency of the  $GFR\alpha1^-$  subpopulation and the default in the transition from  $GFR\alpha1^+$  to  $GFR\alpha1^-$  (i.e.  $NGN3^+$ ) cells were exacerbated (Fig. 4D). We observed also an increase of the proportion of  $KIT^+$  differentiating spermatogonia in the old KO mice, but to a lesser extent than for the undifferentiated spermatogonia (Fig. 4E). The number of  $KIT^+$  differentiating spermatogonia was even markedly decreased in aged KO testis (Fig. 4F), and the ratio of  $KIT^+/KIT^-$  cells was greatly reduced in KO compared to CTRL aged testis (Fig. 4G), indicating a default in the differentiation into  $KIT^+$  spermatogonia. This means that an accumulation of undifferentiated spermatogonia is observed with aging in KO compared to CTRL mice. However, 4N and 2N meiotic populations and spermatids were produced even if a severe decrease of their number was noted (Fig. S4F), evoking a potential skipping of the amplifying step of the differentiating spermatogonial population in aged KO testis.

## Transcriptomic analysis of adult KO SSCs

To characterize molecular features of undifferentiated spermatogonia in KO, we isolated by flow cytometry  $\beta 2 M^{-} \alpha 6^{+} K I T^{-}$  undifferentiated spermatogonia and  $\beta 2 M^{-} \alpha 6^{+} K I T^{+}$  differentiating spermatogonia from 3 months-old control and KO mice and analysed them by RNA-Seq (Fig. 5). About 17,000 genes were detected in our RNAseq analysis, the comparison of differentially expressed genes (DEGs) between  $K I T^{-}$  and  $K I T^{+}$  spermatogonial fractions from CTRL mice confirmed the typical gene expression program of undifferentiated and differentiating spermatogonia respectively (3198 genes in  $K I T^{-}$  fraction; 3565 in  $K I T^{+}$  fraction  $p < 0.05$  and fold change  $> 1.5$ ). DEGs associated with SSCs and undifferentiated progenitors (e.g., *Gfra1*, *Ret*, *Id4*, *Plvap*, *Eomes*, *Nanos2*, *Pdx1*, *Lhx1*, *Nefm*, *Foxc2*, *T*, *Tspan8*, *Shisa6*, *Egr2*, *Upp1*, *Neurog3*, *Sox3*, *Sox2*, *Utf1*, *Sall4*, and *Piwil4*) were upregulated in  $K I T^{-}$  undifferentiated cell fraction while genes enriched differentiating progenitors were found in  $K I T^{+}$  fraction (e.g., *Kit*, *Stra8*, *Prdm9*, *Meioc*, and *Meiob*). When  $K I T^{-}$  undifferentiated spermatogonia from CTRL and KO mice were compared, the volcano plot and heatmap illustrated that 312 genes were differentially expressed (171 down-regulated and 159 up-regulated, Fig. 5A and B). In adult KO transcriptome of undifferentiated spermatogonia, we did not observe any overlap with differentially expressed genes (DEGs) from pup SSCs culture treated with an inhibitor of DOT1L (0% for up and down-regulated genes, Lin et al., 2022). Notably, the downregulation of *Hox* and *Dlx* genes, that were previously reported to play a role in DOT1L effects on SSCs (Lin et al., 2022), was not detected in adult KO transcriptome, although *Hox* (*HoxC4*, *HoxC6*, *HoxC8*, *HoxC9*, *Hoxc10*, *Hoxc11*) and *Dlx* genes (*Dlx3*, *Dlx4*) were expressed in the transcriptome of CTRL adult undifferentiated spermatogonia. The comparison of DEGs in KO undifferentiated spermatogonia between adult and neonatal mice (dataset from Y. Okada, personal communication) revealed also a poor redundancy between the 2 developmental stages (18/312, 5.7 % of the adult DEGs, Fig. 5C). Hence, the consequences of the loss of DOT1L activity in SSCs seems to be quite different at the transcriptional level between prepubertal and adult SSCs. Of note, the expression of SSC-markers genes, such as *Gfra1*, *Ret*, *Id4*, *Eomes*, *Tspan8*, *Pax7*, was not significantly altered in adult KO undifferentiating spermatogonia. g:profiler analysis of DEGs revealed a shift in gene expression program (Fig. 5D), with notably an upregulation of the metabolic pathways (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase NAD<sup>+</sup>-non-phosphorylating activity, 3-deoxyglucosone dehydrogenase activity, aldehyde

dehydrogenase-NAD<sup>+</sup> activity, oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor, catalytic activity, benzaldehyde dehydrogenase-NAD<sup>+</sup> activity, fructosamine catabolic process, HIF3a). Notably, aldehyde dehydrogenases (ALDHs) *Aldh3b3*, *Aldh1a1* and *Aldh1a7* were found highly expressed in KO undifferentiated spermatogonia. These enzymes catalyse the detoxification of toxic aldehydes. ALDH3 family members are responsible for the removal of lipid-derived aldehydes. *Aldh1a1* (aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1) encodes a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase ensuring the final step in retinoic acid production (Duester, 2000; Bowles *et al.*, 2009). *Aldh1a7* (aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7) is very closely related to *Aldh1a1*, but does not seem to catalyse the retinoic aldehyde. Higher expression of *Aldh1a1* could lead to unexpected RA signaling in KO undifferentiated spermatogonial population, the *Bhlhe40/Stra13*, a gene induced by RA, showing also an higher expression in the transcriptomic data. Interestingly, high RA signaling in undifferentiated spermatogonia could lead to defects in the spermatogonial differentiation process, as reported in the *Dmrt1*-deficient mice (Zhang *et al.*, 2016; Zhang and Zarkower, 2017). The TNF $\alpha$  signaling pathway was also found overrepresented in the transcriptome of KO mice (Fig. 5D). This finding could be related to the observation of a premature aging in the KO mice that we observed in the undifferentiated spermatogonial pool, regarding the role of TNF in aging.

### **DOT1L plays *in vitro* a role in sensitivity of SSCs to genotoxic stress and is required for cell cycle arrest after DNA damage**

As *Dot1l* was suggested to be implicated in DNA damage response (DDR), we investigated the sensitivity of KO SSCs to genotoxic (Wood, Tellier and Murphy, 2018). The colony forming capacity from CTRL and KO SSCs were assessed 10 days after mitomycin C treatment or irradiation. KO SSCs display *in vitro* an increased sensitivity to genotoxic stress, as shown by the diminution of colony forming capacity (Fig. 6A). This increased radiosensitivity of KO SSCs was not associated with a higher generation of DNA damage  $\gamma$ H2AX or 53BP1 foci (Fig. 6B). A BrdU cell cycle analysis of SSCs was performed 24 h after irradiation to study cell cycle arrest of the DDR (Fig. 6C). We observed a strong diminution of BrdU<sup>+</sup> CTRL SSCs, meaning that CTRL SSCs stopped to enter in S-phase and proliferate 24 h after irradiation, indicative of a G1/S

checkpoint in irradiated SSCs. On the contrary, there was no significant difference in the number of BrdU<sup>+</sup> KO SSCs before and 24h after irradiation, a high proportion of irradiated KO SSCs still proliferating. Those results suggest the impairment of the G1/S checkpoint of the DDR 24 hours after irradiation in KO SSCs.

Ataxia-Telangiectasia mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR), members of the phosphatidylinositol 3-kinase-like family of serine/threonine protein kinases, play important roles in the cellular response to DNA damage and in the activation of signal transduction pathways via the phosphorylation of CHK2 and CHK1 that induce G1/S cell cycle arrest (Caron *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2021). In order to assess the role of ATM and ATR in cell cycle arrest of SSCs, WT SSCs were incubated with VE-822 ATR inhibitor, LY2603618 CHK1 inhibitor, KU-60019 ATM inhibitor and inhibitor II hydrate CHK2 before irradiation. 24 h after irradiation, the downregulation of ATR and CHK1 did not affect the G1/S arrest of SSCs, however a high number of BrdU<sup>+</sup> irradiated SSCs were still detected in presence of ATM and CHK2 inhibitors (Fig. 6D), meaning that they continue to enter in S-phase and proliferate, and were not blocked at the G1/S checkpoint of the DDR. Hence, the kinase signaling pathway ATM-CHK2 is mainly responsible for the G1/S arrest of SSCs after irradiation. When KO SSCs were irradiated, we noted that ATM inhibition using KU-60019 did not change significantly the percentage of BrdU<sup>+</sup> cells 24h hours after irradiation (Fig. 6E), meaning that ATM inhibition has no major effects on the G1/S arrest of KO SSCs. The effects of ATM inhibition and DOT1L deficiency are not additive, suggesting that DOT1L and ATM lie in the same pathway responsible for the G1/S arrest of irradiated SSCs.

## DISCUSSION

Our postnatal conditional *Stra8-Cre* knockout mouse model showed that *Dot1l* is required for maintaining long-term spermatogenesis, in opposite to its dispensable role for oogenesis (Liao and Szabó, 2020). *Dot1l* deletion led to the attrition of spermatogenesis homeostasis and to the loss of functional SSCs in a cell-autonomous manner. Lin et al. reported recently the involvement of DOT1L in SSCs self-renewal using a *Ddx4-Cre* model in which *Dot1l* is precociously invalidated in the fetal germinal lineage (Lin et al., 2022). Here, we go further in the description and the understanding of the defects occurring in the undifferentiated spermatogonial population containing the SSCs pool. We draw similar conclusions regarding the crucial role of DOT1L in SSCs, however we also observe other phenotypes and our data allow us to clarify the contribution of DOT1L in the ontogenesis, the maintenance of adult CSGs, and the homeostasis of the population of undifferentiated spermatogonia.

The pool of GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> SSCs is found in the population of undifferentiated spermatogonia, the commitment to spermatogenic differentiation occurs simultaneously with the downregulation of GFR $\alpha$ 1 and the upregulation of NGN3. NGN3<sup>+</sup> undifferentiated spermatogonia behave as transit amplifying progenitors, and contribute rarely to the long-term homeostasis of the testis, but they can regenerate the pool of GFR $\alpha$ 1-positive cells after tissue insult (Nakagawa, Nabeshima and Yoshida, 2007; Nakagawa et al., 2010; Carrieri et al., 2017). In KO mice, in addition to the attrition of the size of the GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> SSCs pool, we observed also a problem of differentiation to GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> undifferentiated spermatogonia. Of note, old CTRL mice displayed the same phenotype than young KO mice, suggesting that a premature aging of the pool of undifferentiated spermatogonial could occur in KO mice. In line with this, we noted a reduced functionality of KO SSCs (capacity to form colony *in vitro*, defect in their regenerative potential after testicular transplantation). KO SSCs show also *in vitro* an increased sensitivity to genotoxic stress. In old KO mice, a worsening of the fertility defect was particularly noted with aging, and an additional phenotype was detected, i.e. the accumulation of undifferentiated spermatogonia. Hence, maintenance and differentiation of the undifferentiated spermatogonia are altered in young and old KO testis.

A dramatic effect of *Dot1l* deficiency on the pool adult SSCs and fertility was noted in the *Vasa-Cre* model when *Dot1l* invalidation starts from fetal life in the germline (Lin *et al.*, 2022) (Okada, personal communication). The phenotype we observe in the *Stra8-Cre* model is less drastic, although the SSCs pool is severely affected. In this model, CRE expression occurs in the prepubertal period, when prepubertal SSCs differentiate to establish the founders of the adult SSCs pool. Altogether, these data suggest that *Dot1l* is more critical at the neonatal/prepubertal period when definitive pool of adult SSCs is established, and *Dot1l* deficiency should be less crucial for the long-term homeostasis of the SSCs pool in adult. Of note, future adult SSCs pool must pass through the *Ngn3*-expressing state during neonatal/prepubertal period (Yoshida *et al.*, 2006) and we observed a problem of differentiation from GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>PLVAP<sup>-</sup> SSC to GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> undifferentiated spermatogonia, which are NGN3<sup>+</sup>, in our adult KO mice model. Hence, this *Ngn3*-expressing state at the prepubertal stage could be a critical step in the ontogenesis of the pool of adult SSCs. This point will require future investigations.

H3K79 methylation levels are considered to correlate with active transcription. In line with this, the transcriptome of undifferentiated spermatogonia from adult KO and from pup SSCs, either treated in culture with an inhibitor of DOT1L (Lin *et al.*, 2022) or purified from pubertal KO mice (dataset from Y. Okada, personal communication), were completely different. Notably, Wang's team recently reported that DOT1L activates the transcription of the *HoxC* homeobox gene cluster in SSCs (Lin *et al.*, 2022), but we did not observe any variations of *Hox* genes expression in the adult KO transcriptome. Hence, the loss of DOT1L activity and H3K79 methylation impacts differently the transcriptional program from neonatal/prepubertal and homeostatic adult SSCs. This could contribute to the different effects of the DOT1L deficiency on prepubertal and adult SSCs. We observed an increased expression of *Bhlhe40* in KO mice, a basic helix-loop-helix transcription repressor factor that is regulated by GDNF in rat SSCs (Schmidt *et al.*, 2009). *Bhlhe40* was found to regulate SSCs number in culture, suggesting a role in maintaining the undifferentiated state of SSCs. In mice, *Bhlhe40* is an important regulator of immunity, and is required for the self-renewal and maintenance of large peritoneal macrophages (Jarjour *et al.*, 2019). A potential role of *Bhlhe40*

in the default of differentiation and homeostasis of the *Dot1l*-deficient undifferentiated spermatogonia, especially in old KO mice, needs further investigation.

The phenotype of accumulation of undifferentiated spermatogonia with aging in KO testis, although a decay of the stem cell pool is detected in young mice, could first appear as counterintuitive. A progressive attrition of the stem cell pool with aging should be expected if *Dot1l* deficiency only affected stem cell renewal. However, this phenotype was also recently observed in a KO model of DNMT3A, an epigenetic modifier of DNA methylation. The phenotype observed in KO model with aging is also reminiscent of the *Dmrt1* deficient model, considering the accumulation of undifferentiated spermatogonia and the decrease of the differentiating spermatogonial population in proportion. In *Dmrt1* KO models, DNMT1 is required perinatally for germ cell, like in *Vasa-Cre* and *Stra8-Cre* models of *Dot1l*, but a precocious meiotic entry of DNMT1-deficient undifferentiated spermatogonia was also suggested to bypass the proliferation and differentiation step of KIT<sup>+</sup> differentiating spermatogonia during adult steady state spermatogenesis (Zhang *et al.*, 2016; Zhang and Zarkower, 2017). An abnormal activation of the retinoic acid signaling was described in the *Dmrt1* KO undifferentiated population that could explain this phenotype. Additional analysis should be performed in order to investigate the retinoic acid pathway in old KO *Dot1L* mice. Although germ cell development is not blocked, the skipping of the amplification step of differentiating spermatogonia can contribute to the reduced germ cell numbers observed in aged KO *Dot1L* mice.

H3K79 methylation via Dot1 methyltransferase activity in yeast is implicated in DNA damage response (DDR) and activation of cell cycle checkpoints. Studies in mammalian cells have also shown that a deficiency of DOT1L increases sensitivity to ionizing and UV radiation (Wood, Tellier and Murphy, 2018). KO SSCs show *in vitro* an increased sensitivity to genotoxic stress such as  $\gamma$ -irradiation or mitomycin C DNA cross-linking agent exposure (colony forming assay). This increased radiosensitivity of KO SSCs was not associated with a higher generation of DNA damage through analysis of  $\gamma$ H2AX foci. It was previously reported that the recruitment of 53BP1 to sites of DNA damage occurs via binding to methylated H3K79 (Huyen *et al.*, 2004) but we did not detect changes in the formation of 53BP1 foci in irradiated KO SSCs, in agreement with data showing that H4K20me<sub>2</sub>, instead of H3K79 methylation, could be

implicated (Botuyan *et al.*, 2006; Jacquet *et al.*, 2016). Nevertheless, a BrdU-pulse cell cycle analysis of irradiated KO SSCs revealed an impairment of G1/S checkpoint when DOT1L is deficient. *DOT1* was described to regulate in yeast the G1/S DNA damage checkpoint, through its lysine methyl transferase activity (Wysocki *et al.*, 2005). Interestingly, we found that the kinase signaling pathway ATM-CHK2 is mainly responsible for the G1/S arrest of WT SSCs after irradiation, and that ATM inhibition and *Dot1l* deficiency were not additive on the G1/S arrest of irradiated SSCs, suggesting that DOT1L and ATM are found in the same pathway. How DOT1L or H3K79me3, could interact with ATM remains unknown. Nevertheless, the involvement of DOT1L in the DNA damage response highlights the key role this enzyme plays in genomic integrity and stability of SSCs.

In summary, our investigations precise the role of DOT1L in the SSCs and spermatogonial pool maintenance, being essential for spermatogenesis and fertility. It provides new insights regarding the epigenetic modifiers that regulate SSCs ontogenenesis, homeostasis and differentiation. DOT1L is implicated in Mixed Lineage Leukemia (MLL) leukemic stem cells regulation (Jo *et al.*, 2011), and is indeed an attractive target for therapy for cancer treatment, considering the role of *DOT1L* in. Our data and others (Lin *et al.*, 2022) underline the negative effects of the loss of DOT1L on the establishment of the SSCs pool, especially during the neonatal/prepubertal period. The high frequency of *MLL* gene rearrangements in infant leukemias highlights the need to carefully study the effects of DOT1L inhibition on fertility. Considering the emergence of the epigenetics modulators in cancer cell regulation, these findings which could help to design future therapeutic cancer protocols, to prevent side effects of cancer therapy in order to preserve human male fertility.

## Material and Methods

### Mouse strains and genotyping

Conditional *Dot1l* knockout mice were obtained from the Knockout Mouse Project (CSD29070) (thanks to F. Van der Leeuwen) (Jo *et al.*, 2011) and a mouse transgenic line in which *Dot1l* exon 2 is flanked by *LoxP* sites. Tg(*Stra8-iCre*)1Reb/J were obtained from the Jackson lab (JAX stock #017490) (Sadate-Ngatchou *et al.*, 2008). *Dot1l<sup>Fl/Δ</sup>*; *Stra8-Cre* animals were generated. All animals analyzed in this study were from a C57BL6/J background. Genotyping of animals were realized as previously described (Blanco *et al.*, 2022). The mice were housed in our animal facility. Experiments were performed in compliance with European legislation and the Ethics Committee of the French Ministry of Agriculture (Agreement B9203202).

### Testicular single-cell suspensions and immunomagnetic and flow cell sorting

Mice testicular single-cell suspensions were prepared from 3-4-week-old or 2-3-month-old C57BL/6 mice as previously described (Lassalle *et al.*, 2004). The immunomagnetic selection of  $\alpha 6^+$  cells was performed using anti- $\alpha 6$  integrin-PE (GoH3) (BD Pharmingen) and anti-PE microbeads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. Hoechst staining (5  $\mu\text{g/ml}$ ) of the cell suspensions was performed as described previously (Lassalle *et al.*, 2004). Cells were then labeled with  $\beta 2\text{m-FITC}$  (Santa Cruz), anti-CD117-APC (2B8, BD Pharmingen), goat anti- GFR $\alpha 1$  (R&D) and rat anti-PVLAP-biotin (Biolegend) antibodies. Then cells were incubated with BV421-anti goat antibody (Jackson) and SAV-PC7 (Ebiosciences). Propidium iodide (Sigma) was added before cell sorting or analysis to exclude dead cells. Flow analysis and sorting were performed on ARIA and flow cytometers (Becton Dickinson), and Aurora spectral cytometer (Cytex).

### SSCs and MEF culture

To derive adult SSC lines from adult KO and CTRL mice,  $\alpha 6^+$ -c-Kit- $\beta 2\text{M}^-$  germinal cells were isolated and maintained on mitomycin-C-treated MEFs as previously described (Barroca *et al.*, 2009b). The SSC culture medium was composed of Stem Span (Stemcell Technologies) and B27 supplement (Life Technologies) and supplemented with recombinant human GDNF (40 ng/ml, R&D Systems), recombinant rat GFR $\alpha 1$  (300 ng/ml, R&D Systems), FGF2 (1 ng/ml, Life

Technologies), and ES-Cult™ Fetal Bovine Serum (1%, Stemcell Technologies). Every 3-4 days, SSC clusters were split using enzymatic digestion with 0.05% trypsin-EDTA (Life Technologies). SSCs were used for experiments after at least 1.5 months of culture. For chemical inhibition of DOT1L, prepubertal and adult wild type SSCs were treated with either DMSO or SGC0946 (chemical DOT1L inhibitor) at 5 $\mu$ M. MEF cultures were established by trypsin digestion of C57BL/6 13.5 dpc embryos, and the resulting cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, L-glutamine and penicillin/streptomycin.

### **Testicular transplantation**

C57BL6 mice were used as the recipients for cell transplantation. To deplete endogenous spermatogenesis, the recipient mice were treated at 6-8 weeks of age with busulfan (40 mg/kg at least 4 weeks before donor cell transplantation). KO and CTRL SSCs in culture were transduced with pTRIP-MND-GFP, and GFP-positive SSCs were purified by flow cytometry. GFP-positive donor cells were resuspended in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 mg/ml DNase I (DN25, Sigma-Aldrich) and 4% trypan blue solution (T8154, Sigma-Aldrich) for transplantation as previously described (Barroca et al., 2009). A 10-microliter solution of donor cells was introduced into the seminiferous tubules of the testis of the recipient mouse via an injection through the efferent ductules as previously described. Ten weeks after transplantation, the recipient testis were collected and analyzed by either macroscopic observation of fluorescence in mice. Macroscopic observations of recipient testis tissues were performed using an Olympus epifluorescence microscope to detect the presence of GFP- fluorescent seminiferous tubules.

### **Whole-mount immunostaining, tissue clearing, 3D imaging and analysis**

Testicular biopsies were first incubated at room temperature (RT) on a rotating shaker in a solution (PBSGT) of PBS1X containing 0.2% gelatin (Prolabo), 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 0.1 g thimerosal for 24 hr (47). Samples were next transferred to PBSGT containing 0.1% saponin and the primary antibody anti- GFR $\alpha$ 1 and PLZF (R&D) and rotated at 70 rpm for 1 week at 37°C. This was followed by six washes for 30 min in PBSGT at RT. Next, samples were incubated in secondary antibodies and TO-PRO3 (1/200e, T3605, Life Technologies) diluted in PBSGT overnight at 37°C. After six washes for 30 min in PBSGT at RT, samples were stored at

4°C in PBS until clearing. For clearing, the 3DISCO procedure was used (48). Imaging of transparized embryos was realized using an ultramicroscope (LaVision BioTec) and a Nikon A1 confocal microscope. Images and 3D volumes were generated using Imaris x64 software (version 8.2.1, Bitplane). Stack images were first converted to Imaris files (.ims) using ImarisFileConverter.

### **BrdU experiment**

First, 100 000 cells were inoculated in 24-well plates with a volume of 500 µl. The cells were incubated at 37°C for 24 h after irradiation. BrdU at the final concentration of 30 µg/l was added before the termination of culture. Then, 2 h later, the cells were fixed and permeabilized using a Cytofix/Cytoperm kit (BD Pharmingen), labelled with anti-BrdU-APC antibody and DAPI. Analyses were performed on LSR II and CANTO flow cytometers (Becton Dickinson).

### **Immunofluorescence staining and microscopy.**

Cells were plated onto 96-wells plates 1 day before irradiation. 1 after 1 Gy irradiation, they were fixed with 5% formaldehyde for 10 min and then washed with PBS. Samples were blocked (0.5% NP-40, 5% milk powder, 1% fetal bovine serum) for 30 min. After being washed once with PBS, cells were incubated with anti-γH2AX Ser139 and 53BP1 primary antibodies for 45 to 60 min. Coverslips were washed with PBS and then incubated with secondary antibodies for another 45 to 60 min. They were then washed with PBS and stained with 0.1 µg/ml DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) for 45 s. Images were obtained using a confocal microscope.

### **Computer assisted sperm motility analysis (CASA)**

Sperm motility was analyzed by Computer-assisted sperm analysis (CASA) systems as previously described (Blanco et al., 2022).

### **Protein extraction and Western blot**

Protein samples were analysed as previously described (Blanco et al., 2022).

### **Sample preparation for RNA-seq**

Total RNA from sorted  $\alpha$ -6<sup>+</sup>KIT<sup>-</sup> and  $\alpha$ -6<sup>+</sup>KIT<sup>+</sup> spermatogonial fractions was extracted using the Ambion RNAqueous micro kit (Thermo Fisher) following manufacturers' instructions. Quantity and quality were assessed using Bioanalyzer chips (Thermo Fisher). Libraries were prepared using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) according supplier recommendations. Paired-end sequencing of 100bp reads was then carried out on the Illumina HiSeq4000 system. RNAseq data were analyzed as previously described (Blanco et al., 2022).

### **Code availability**

The fully reproducible and documented analysis is available on github at .

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed in Graphpad Prism 7. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired Student's t test was used, unless otherwise stated. Statistical significance is indicated in figures as follows: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001.

## REFERENCES

- Aloisio, G.M. *et al.* (2014) 'PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis', *The Journal of Clinical Investigation*, 124(9), pp. 3929–3944. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI75943>.
- Bao, J. *et al.* (2013) 'Incomplete cre-mediated excision leads to phenotypic differences between Stra8-iCre; Mov10l1(lox/lox) and Stra8-iCre; Mov10l1(lox/Δ) mice', *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 51(7), pp. 481–490. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvg.22389>.
- Barroca, V. *et al.* (2009a) 'Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo', *Nature Cell Biology*, 11(2), pp. 190–196. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1826>.
- Barroca, V. *et al.* (2009b) 'Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo', *Nature Cell Biology*, 11(2), pp. 190–196. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1826>.
- Blanco, M. *et al.* (2022) 'The histone methyltransferase DOT1L regulates chromatin reorganization and gene expression during the postmeiotic differentiation of male germ cells'. *bioRxiv*, p. 2022.10.17.512530. Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.10.17.512530>.
- Botuyan, M.V. *et al.* (2006) 'Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair', *Cell*, 127(7), pp. 1361–1373. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.043>.
- Bowles, J. *et al.* (2009) 'Male-specific expression of Aldh1a1 in mouse and chicken fetal testes: Implications for retinoid balance in gonad development', *Developmental Dynamics*, 238(8), pp. 2073–2080. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvdy.22024>.
- Brinster, R.L. and Avarbock, M.R. (1994) 'Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), pp. 11303–11307.
- Brinster, R.L. and Zimmermann, J.W. (1994) 'Spermatogenesis following male germ-cell transplantation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), pp. 11298–11302.

- Caron, P. *et al.* (2015) 'Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks', *Cell Reports*, 13(8), pp. 1598–1609. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.024>.
- Carrieri, C. *et al.* (2017) 'A transit-amplifying population underpins the efficient regenerative capacity of the testis', *The Journal of Experimental Medicine*, 214(6), pp. 1631–1641. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20161371>.
- Cheng, K. *et al.* (2020) 'Unique Epigenetic Programming Distinguishes Regenerative Spermatogonial Stem Cells in the Developing Mouse Testis', *iScience*, 23(10), p. 101596. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101596>.
- Duester, G. (2000) 'Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid', *European journal of biochemistry*, 267(14). Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01497.x>.
- Dura, M. *et al.* (2022) 'DNMT3A-dependent DNA methylation is required for spermatogonial stem cells to commit to spermatogenesis', *Nature Genetics*, 54(4), pp. 469–480. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01040-z>.
- Garbuzov, A. *et al.* (2018) 'Purification of GFR $\alpha$ 1+ and GFR $\alpha$ 1- Spermatogonial Stem Cells Reveals a Niche-Dependent Mechanism for Fate Determination', *Stem Cell Reports*, 10(2), pp. 553–567. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.009>.
- Hara, K. *et al.* (2014) 'Mouse Spermatogenic Stem Cells Continually Interconvert between Equipotent Singly Isolated and Syncytial States', *Cell Stem Cell*, 14(5), pp. 658–672. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.019>.
- Helsel, A.R. *et al.* (2017) 'ID4 levels dictate the stem cell state in mouse spermatogonia', *Development (Cambridge, England)*, 144(4), pp. 624–634. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.146928>.
- Hermann, B.P. *et al.* (2012) 'Spermatogonial stem cell transplantation into Rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm', *Cell stem cell*, 11(5), pp. 715–726. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.017>.
- Huyen, Y. *et al.* (2004) 'Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks', *Nature*, 432(7015), pp. 406–411. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03114>.

- Jacquet, K. *et al.* (2016) 'The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation', *Molecular Cell*, 62(3), pp. 409–421. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.031>.
- Jarjour, N.N. *et al.* (2019) 'Bhlhe40 mediates tissue-specific control of macrophage proliferation in homeostasis and type 2 immunity', *Nature Immunology*, 20(6), pp. 687–700. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0382-5>.
- Jo, S.Y. *et al.* (2011) 'Requirement for Dot1l in murine postnatal hematopoiesis and leukemogenesis by MLL translocation', *Blood*, 117(18), pp. 4759–4768. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327668>.
- Kim, W., Choi, M. and Kim, J.-E. (2014) 'The histone methyltransferase Dot1/DOT1L as a critical regulator of the cell cycle', *Cell Cycle*, 13(5), pp. 726–738. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.28104>.
- Komai, Y. *et al.* (2014) 'Bmi1 expression in long-term germ stem cells', *Scientific Reports*, 4(1), p. 6175. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep06175>.
- Lassalle, B. *et al.* (2004) "'Side Population" cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells', *Development (Cambridge, England)*, 131(2), pp. 479–487. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.00918>.
- Li, F. *et al.* (2021) 'Shift in G1-Checkpoint from ATM-Alone to a Cooperative ATM Plus ATR Regulation with Increasing Dose of Radiation', *Cells*, 11(1), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11010063>.
- Liao, J. and Szabó, P.E. (2020) 'Maternal DOT1L is dispensable for mouse development', *Scientific Reports*, 10(1), p. 20636. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77545-6>.
- Lin, H. *et al.* (2022) 'Histone methyltransferase DOT1L is essential for self-renewal of germline stem cells', *Genes & Development*, 36(11–12), pp. 752–763. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.349550.122>.
- McLean, C.M., Karemaker, I.D. and van Leeuwen, F. (2014) 'The emerging roles of DOT1L in leukemia and normal development', *Leukemia*, 28(11), pp. 2131–2138. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2014.169>.
- Mu, W. *et al.* (2014) 'Repression of the soma-specific transcriptome by Polycomb-repressive complex 2 promotes male germ cell development', *Genes & Development*, 28(18), pp. 2056–2069. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.246124.114>.

Nakagawa, T. *et al.* (2010) 'Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment', *Science (New York, N.Y.)*, 328(5974), pp. 62–67. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1182868>.

Nakagawa, T. *et al.* (2021) 'A multistate stem cell dynamics maintains homeostasis in mouse spermatogenesis', *Cell Reports*, 37(3), p. 109875. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109875>.

Nakagawa, T., Nabeshima, Y. and Yoshida, S. (2007) 'Functional Identification of the Actual and Potential Stem Cell Compartments in Mouse Spermatogenesis', *Developmental Cell*, 12(2), pp. 195–206. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.002>.

Sadate-Ngatchou, P.I. *et al.* (2008) 'Cre recombinase activity specific to postnatal, premeiotic male germ cells in transgenic mice', *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 46(12), pp. 738–742. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvg.20437>.

Sarno, F., Nebbioso, A. and Altucci, L. (2019) 'DOT1L: a key target in normal chromatin remodelling and in mixed-lineage leukaemia treatment', *Epigenetics*, 15(5), pp. 439–453. Available at: <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1699991>.

Schmidt, J.A. *et al.* (2009) 'Identification of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Regulated Genes Important for Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in the Rat', *Biology of Reproduction*, 81(1), pp. 56–66. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075358>.

Shinohara, T., Avarbock, M.R. and Brinster, R.L. (1999) 'beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), pp. 5504–5509. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5504>.

Tomizawa, S. *et al.* (2018) 'Kmt2b conveys monovalent and bivalent H3K4me3 in mouse spermatogonial stem cells at germline and embryonic promoters', *Development*, 145(23), p. dev169102. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.169102>.

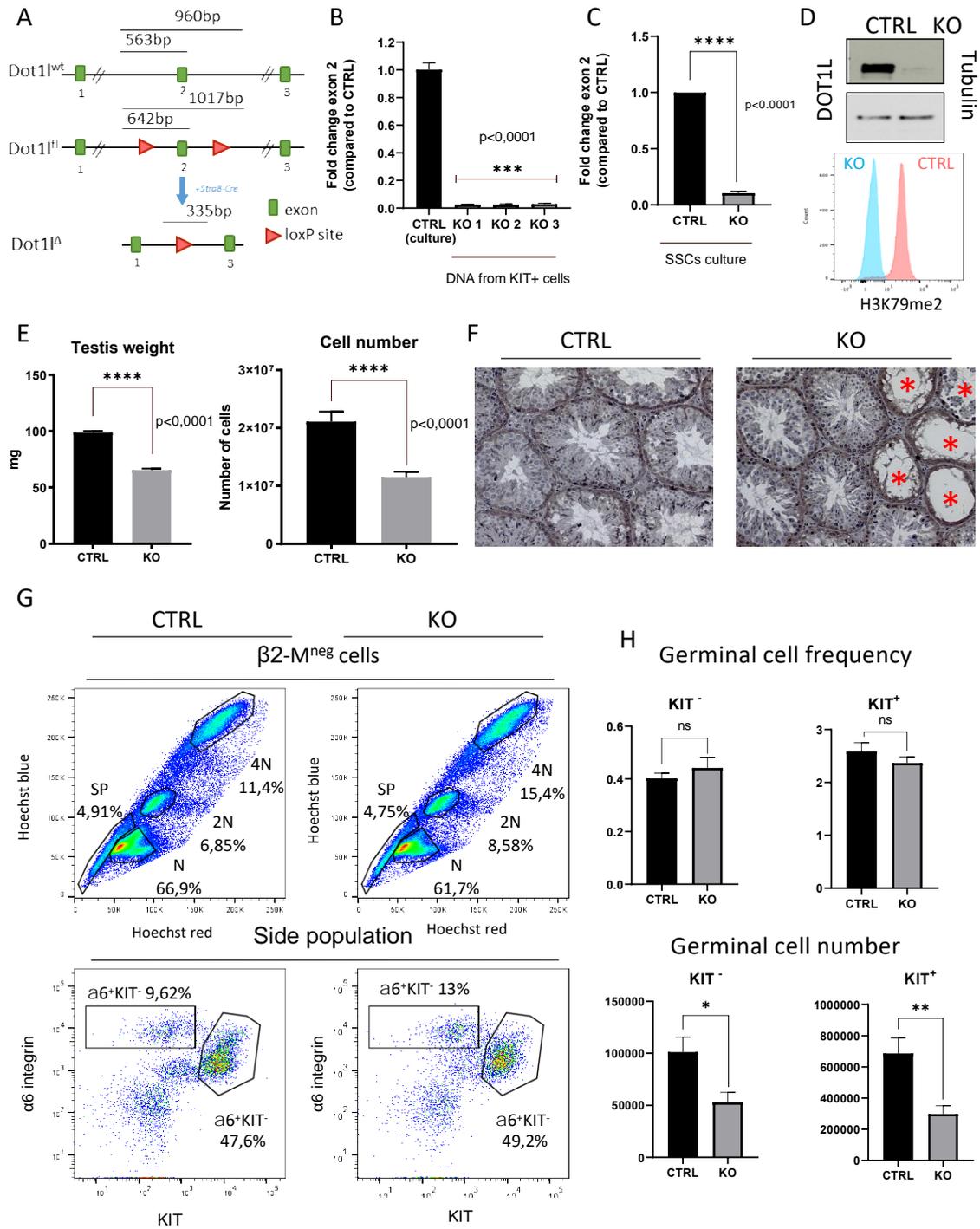
Wood, K., Tellier, M. and Murphy, S. (2018) 'DOT1L and H3K79 Methylation in Transcription and Genomic Stability', *Biomolecules*, 8(1), p. 11. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom8010011>.

Wysocki, R. *et al.* (2005) 'Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9', *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), pp. 8430–8443. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8430-8443.2005>.

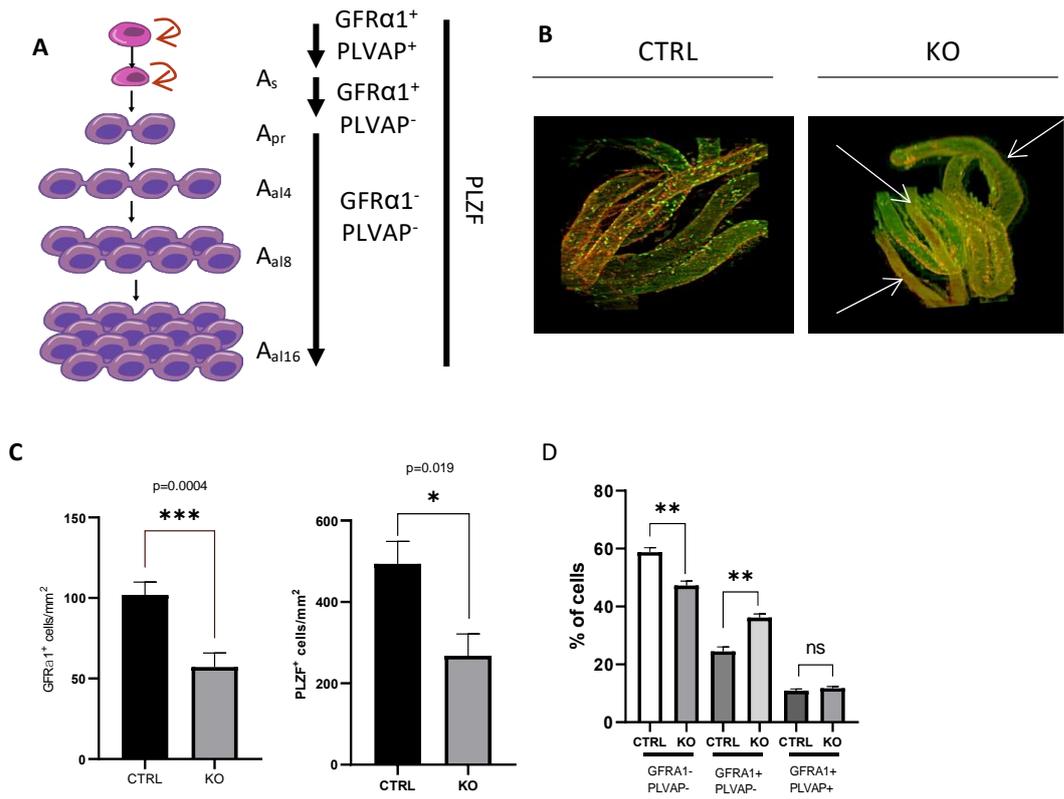
Yoshida, S. *et al.* (2006) 'The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage', *Development (Cambridge, England)*, 133(8), pp. 1495–1505. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.02316>.

Zhang, T. *et al.* (2016) 'DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment', *PLoS genetics*, 12(9), p. e1006293. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006293>.

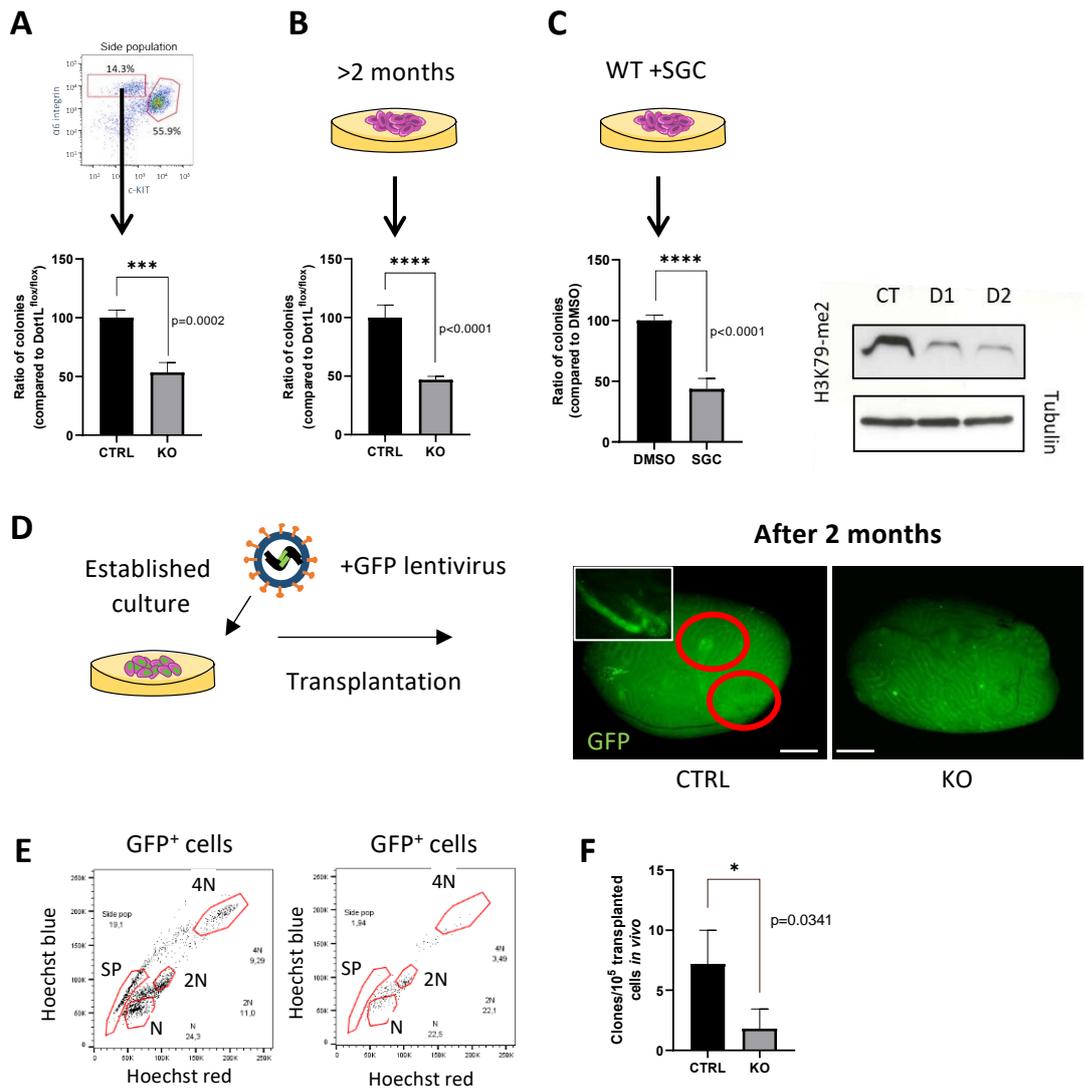
Zhang, T. and Zarkower, D. (2017) 'DMRT proteins and coordination of mammalian spermatogenesis', *Stem cell research*, 24, pp. 195–202. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.07.026>.



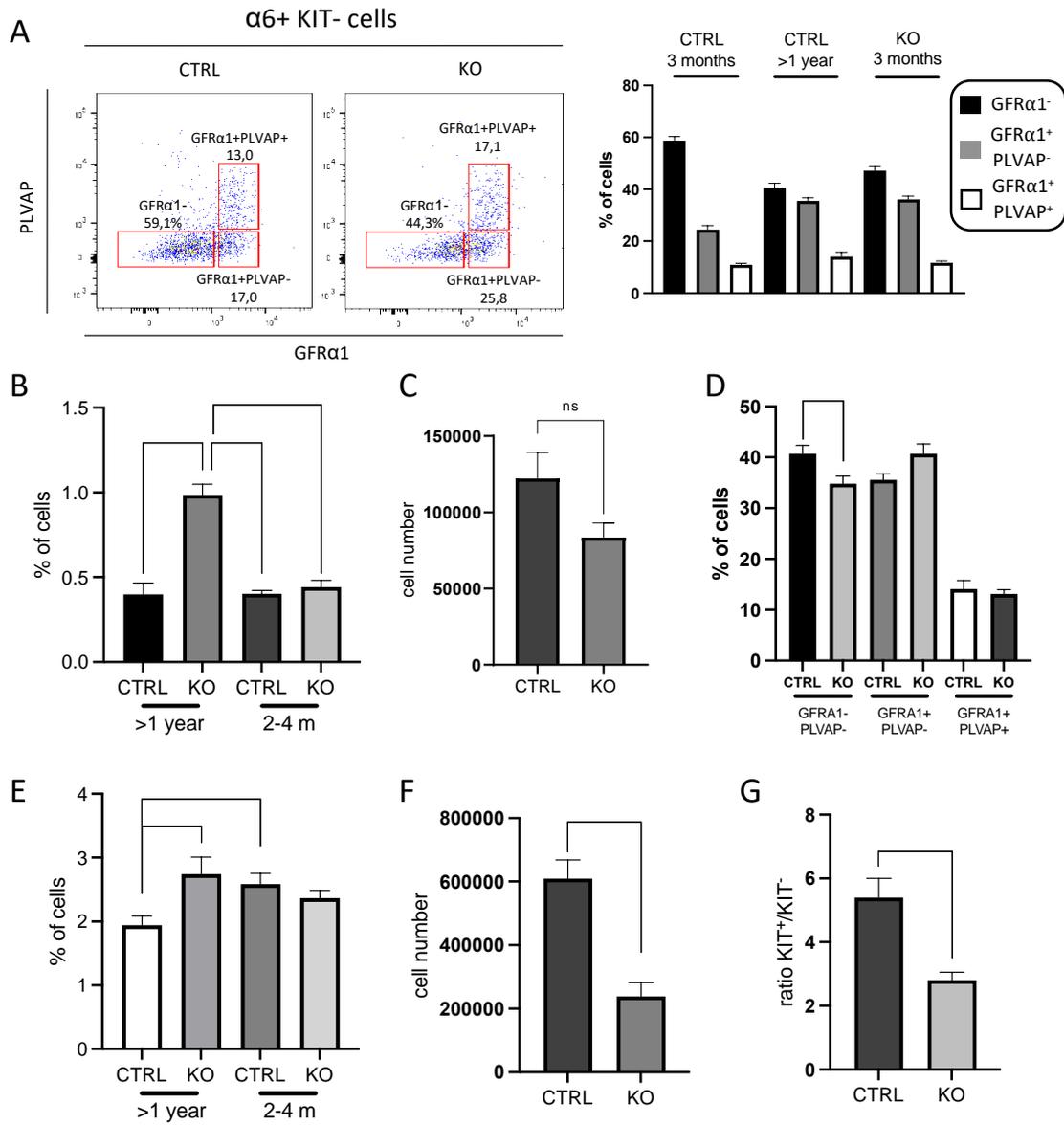
**Figure 1. DOT1L deletion affects the undifferentiated spermatogonial population**



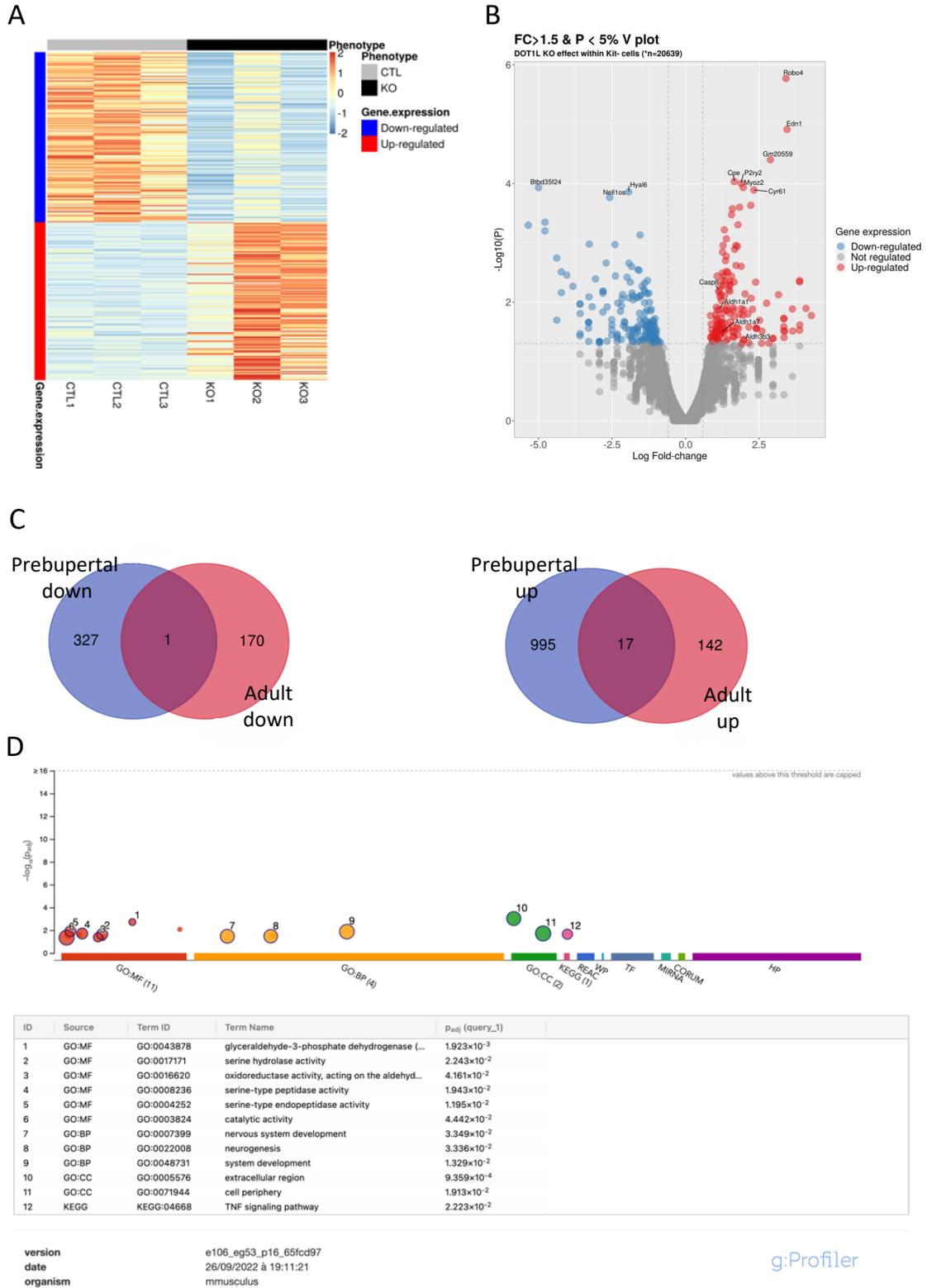
**Figure 2: Dot1L KO testis exhibit a loss of GFRA1+ and PLZF+ spermatogonia**



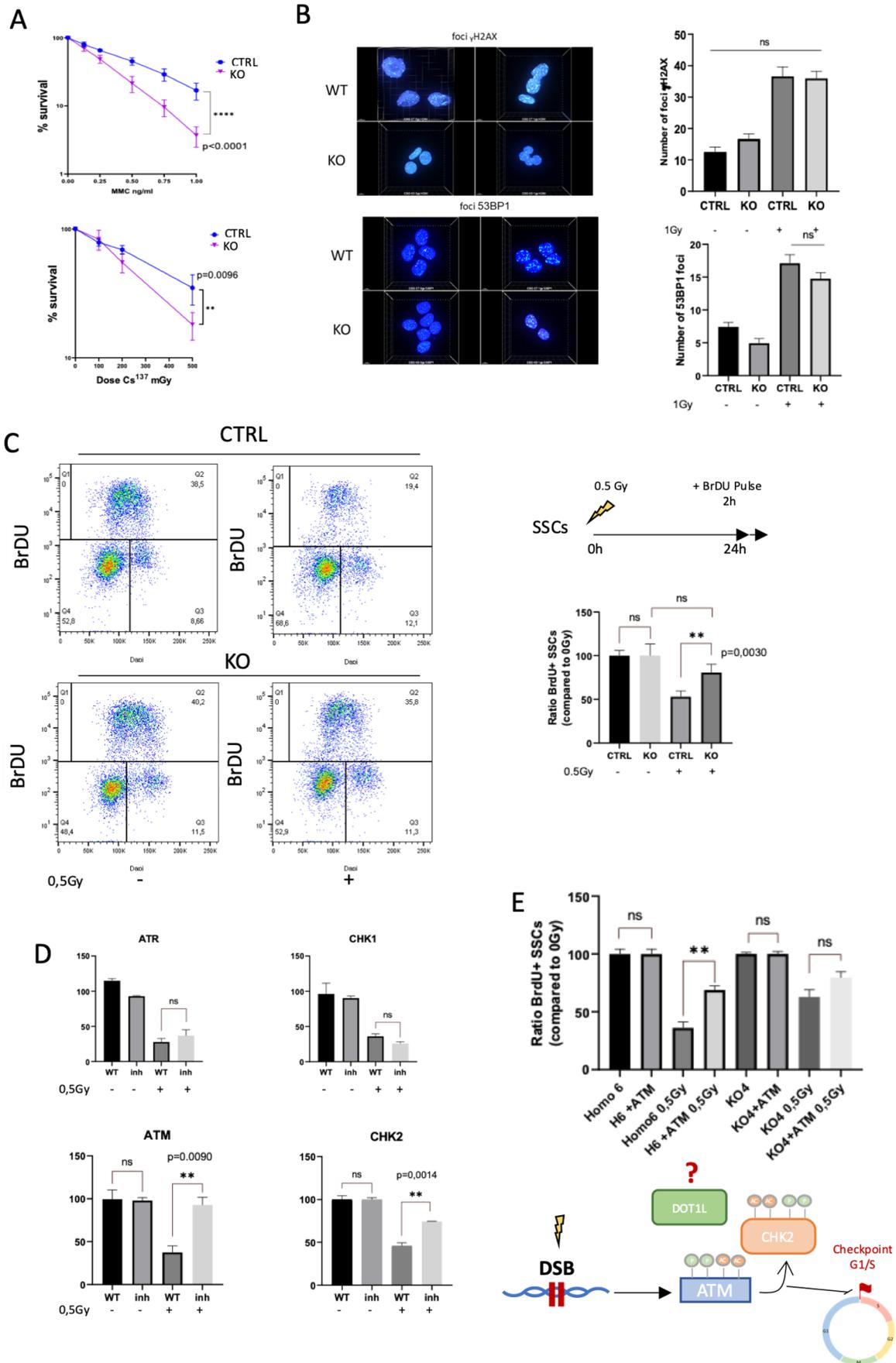
**Figure 3. Loss of DOT1L leads to the impairment of SSCs functionality *in vitro* and *in vivo***

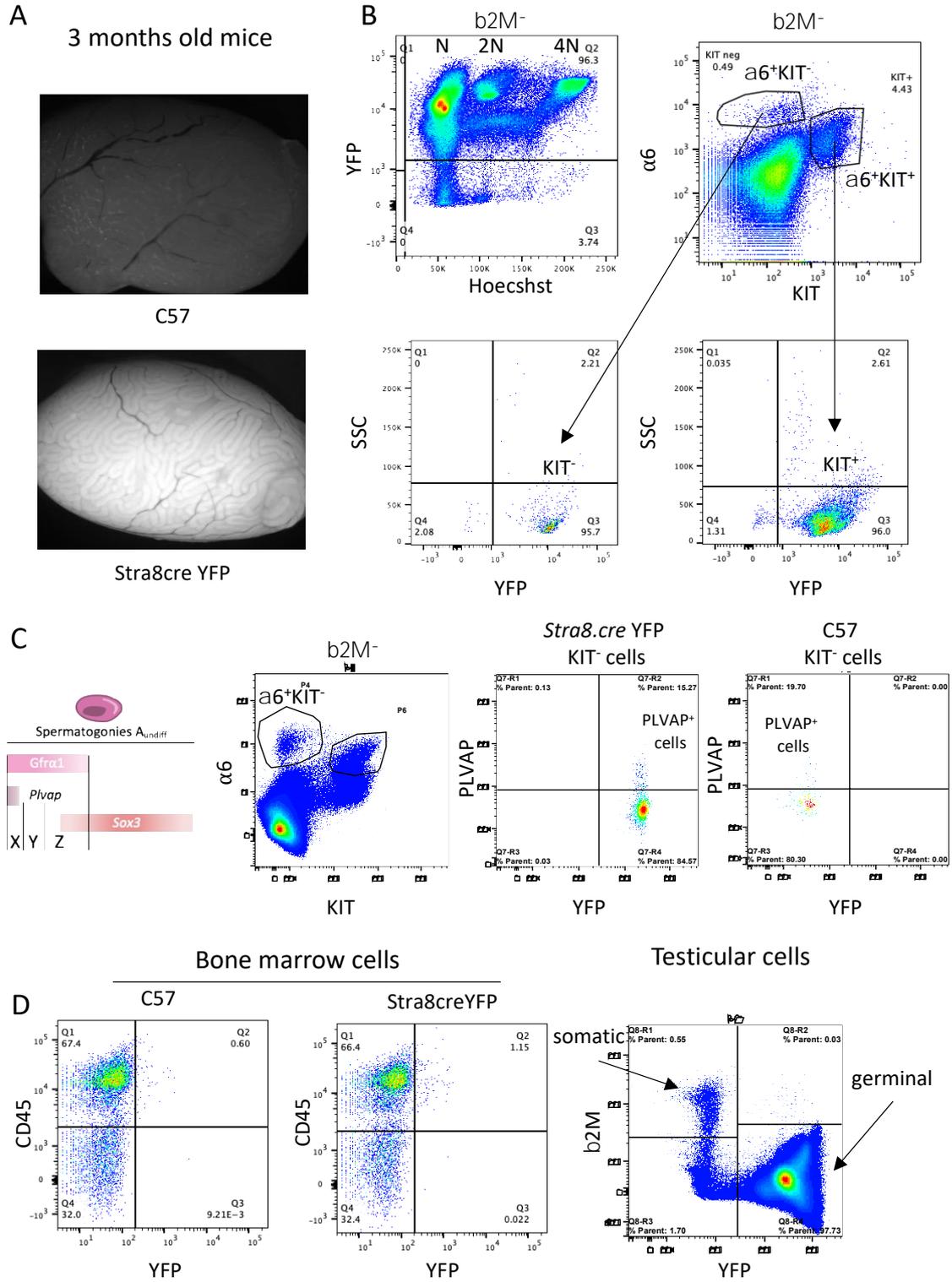


**Figure 4. Accumulation of the undifferentiated spermatogonia in old KO mice**

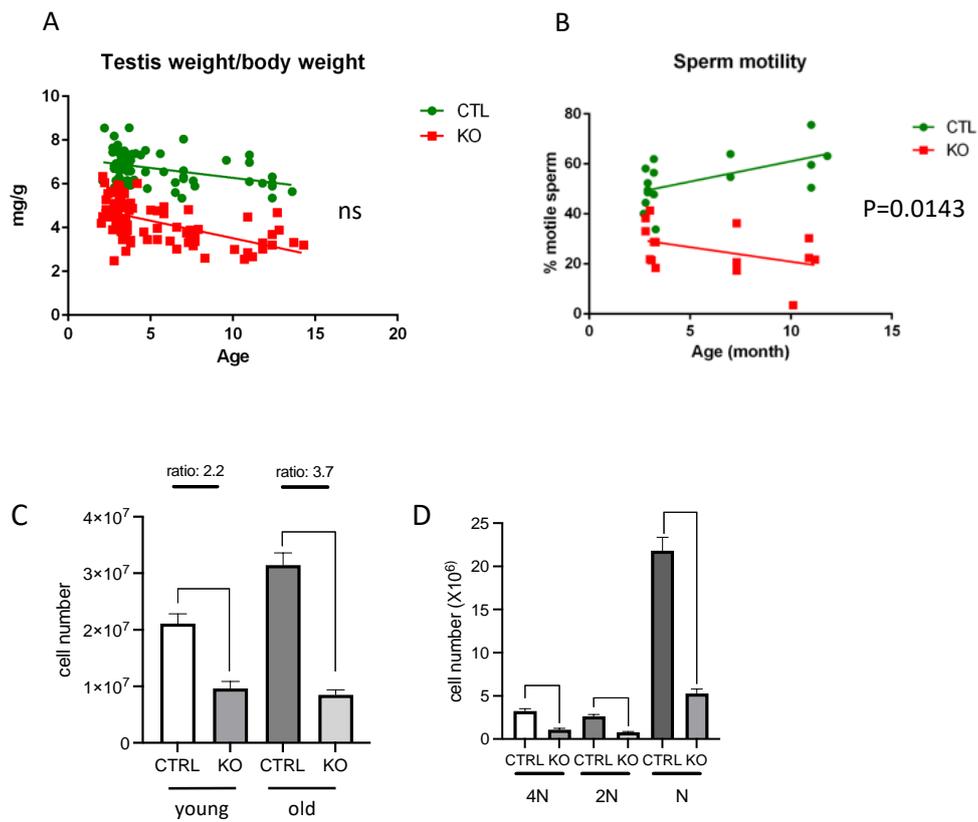


**Figure 5. Transcriptomic analysis of b2M<sup>+</sup>a6<sup>+</sup>KIT<sup>-</sup> undifferentiated spermatogonia in KO mice**





**Figure S1. Loss of DOT1L leads to an increased sensitivity to genotoxic stress**



**Figure S2. Effects of aging on spermatogenesis in KO mice**

	4N		2N		N	
	CTRL	KO	CTRL	KO	CTRL	KO
cell number	2558443 ± 265415	1357221 ± 202340	1515153 ± 174565	804984 ± 127764	15059196 ± 1568913	6876893 ± 1109105
frequency (%)	10,00 ± 0,23	11,48 ± 0,68	5,77 ± 0,28	6,69 ± 0,29	59,30 ± 1,37	55,89 ± 0,90

**Table S1.**

**Figure 1. Figure 1: DOT1L deletion affects the undifferentiated spermatogonial population**

(A) Schematic showing strategy used to delete exon 2 of *Dot1l* using Cre recombinase. (B) Expression level of *Dot1l* exon 2 assessed by qPCR, in spermatogonia KIT<sup>+</sup> deficient for *Dot1l* from 3 mice (n=3; CTRL: SSCs culture from CTRL mice) and (C) in SSCs culture from CTRL and KO mice. (D) Western Blot detection of DOT1L and flow cytometric detection of H3K79me2 in CTRL and KO SSCs culture (E) Diminution of testis weight and testicular cell number in KO and CTRL mice (n=10 KO and n=13 CTRL; body weights are similar in both groups). (F) Histological sections of mice testis show the presence of sertoli cell only (SCO) tubules (red stars) in KO mice. (G) Flow cytometry analysis of CTRL and KO testis according to DNA content (Hoechst 33342 staining),  $\beta$ 2M,  $\alpha$ 6 and KIT. The proportions are indicated in function of the parental gate. (H) Quantification of the frequency and of the cell number of undifferentiated ( $\alpha$ 6<sup>+</sup>KIT<sup>-</sup>) and differentiating ( $\alpha$ 6<sup>+</sup>KIT<sup>+</sup>) spermatogonia (n=10 KO and n=13 CTRL testis).

**Figure 2. Dot1L<sup>Δ/Δ</sup> testis exhibit a loss of GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> and PLZF<sup>+</sup> spermatogonia**

(A) Drawing representing early stages of mouse spermatogenesis in the undifferentiated spermatogonia according GFR $\alpha$ 1, PLVAP and PLZF markers. A<sub>single</sub> (A<sub>s</sub>), A<sub>paired</sub> (A<sub>p</sub>), and A<sub>aligned</sub> (A<sub>al</sub>) spermatogonia. (B) Light sheet fluorescence microscopic imaging of PLZF (red) and GFR $\alpha$ 1 (green) immunofluorescence of the seminiferous tubules of testis from KO and CTRL mice. Arrow, SCO. (C) Quantification of the number of GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> (n=23 KO and n=21 CTRL) and PLZF<sup>+</sup> undifferentiated spermatogonia (n=12 KO and n=22 CTRL). (D) Quantification of the frequency of GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>PLVAP<sup>+</sup>, GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> PLVAP<sup>-</sup> and GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup>PLVAP<sup>-</sup> cells in the  $\beta$ 2M- $\alpha$ 6<sup>+</sup>KIT<sup>-</sup> population of undifferentiated spermatogonia from KO and CTRL testis (n=6) by flow cytometry analysis according to GFR $\alpha$ 1 and PVLAP markers.

**Figure 3. Loss of DOT1L leads to the impairment of SSCs functionality *in vitro* and *in vivo***

(A) *In vitro* colony forming capacity of SSCs after flow cell sorting of  $\alpha$ <sup>+</sup>KIT<sup>-</sup> undifferentiated spermatogonia from testis from CTRL and KO mice. (B) *In vitro* colony forming capacity of SSCs from 2 months-established SSCs culture. (C) *In vitro* colony forming capacity of wild type SSCs in culture treated one week with either DMSO or SGC0946 (chemical DOT1L inhibitor) at 5  $\mu$ M and effects of SGC0946 on the H3K79me2 mark on murine WT SSCs. (D) Regeneration of SSCs from KO and CTRL SSCs culture transduced with GFP lentivirus 2 months after transplantation

in mice previously treated with busulfan. (E) Hoechst fluorescence (red/blue Hoechst fluorescence) analysis of GFP-positive cells in a recipient testis. Side Population (SP), meiotic spermatocytes I (4N) and spermatocytes II (2N), and postmeiotic spermatids (N) are indicated. (F) 2 months after transplantation of  $\Delta/\Delta$  and Flox/Flox SSCs GFP+ in mice previously treated with busulfan. Observation of the testis shows the formation of GFP+ clones (red circles) in  $\Delta/\Delta$  testis and not in Flox/Flox testis. (C) Flow cytometry analysis of spermatogenesis of transplanted testis shows a diminution of GFP+ cells in  $\Delta/\Delta$  vs Flox/Flox. (D) Diminution of the regeneration potential of KO SSCs after transplantation (n=8 transplanted testis for CTRL SSCs, n=5 transplanted testis for KO SSCs, n=3 primary SSCs cultures)

#### **Figure 4. Accumulation of the undifferentiated spermatogonia in old KO mice**

(A) Flow cytometry analysis of CTRL and KO testis in old mice (>1 year) according to GFR $\alpha$ 1 and PLVAP markers in the  $\beta$ 2M $^{-}$  $\alpha$ 6 $^{+}$ KIT $^{+}$  population of undifferentiated spermatogonia. The proportions are indicated in function of the parental gate. Quantification of the frequency of GFR $\alpha$ 1 $^{+}$ PLVAP $^{+}$ , GFR $\alpha$ 1 $^{+}$ PLVAP $^{-}$  and GFR $\alpha$ 1 $^{-}$ PLVAP $^{-}$  cells from young and aged CTRL testis, and aged KO testis (n=6). (B) Frequency of undifferentiated ( $\beta$ 2M $^{-}$  $\alpha$ 6 $^{+}$ KIT $^{-}$ ) in young and aged testis from KO and CTRL mice (n=6). (C) Cell number of undifferentiated spermatogonia ( $\beta$ 2M $^{-}$  $\alpha$ 6 $^{+}$ KIT $^{-}$ ) in aged testis from KO and CTRL mice (n=6). (D) Frequency of GFR $\alpha$ 1 $^{+}$ PLVAP $^{+}$ , GFR $\alpha$ 1 $^{+}$ PLVAP $^{-}$  and GFR $\alpha$ 1 $^{-}$ PLVAP $^{-}$  cells in aged testis from KO and CTRL mice (n=6). (E) Frequency of differentiating ( $\beta$ 2M $^{-}$  $\alpha$ 6 $^{+}$ KIT $^{+}$ ) in young and aged testis from KO and CTRL mice (n=6). (F) Cell number of differentiating spermatogonia ( $\beta$ 2M $^{-}$  $\alpha$ 6 $^{+}$ KIT $^{+}$ ) in aged testis from KO and CTRL mice (n=6). (G) Decrease of the ratio of KIT $^{+}$ /KIT $^{-}$  cells in KO compared to CTRL in aged testis (n=6).

#### **Figure 5. Transcriptomic analysis of $\beta$ 2M $^{-}$ $\alpha$ 6 $^{+}$ KIT $^{-}$ undifferentiated spermatogonia in KO mice**

(A) Heat map of the gene expression of the  $\beta$ 2M $^{-}$  $\alpha$ 6 $^{+}$ KIT $^{-}$  undifferentiated spermatogonia in CTRL and KO mice ( $p < 0.05$ , fold change > 1.5). (B) Volcano plot DEG genes between KO and

CTRL mice ( $p < 0.05$ , fold change  $> 1.5$ ). (C) Comparison of DEGS genes between adult and neonatal/prepubertal transcriptomes from KO mice. (D) g:profiler analysis of DEGs genes.

**Figure 6. Loss of DOT1L leads to an increased sensitivity to genotoxic stress**

(A) Colony forming capacity from CTRL and KO SSCs were assessed 10 days after mitomycin C treatment or irradiation (0.5 Gy). (B) Immunofluorescence labeling of foci gH2AX and 53BP1 1 hour after irradiation at 1Gy (blue= DAPI, Green= Foci) and number of gH2AX and 53BP1 foci ( $n = 60$  to  $90$  cells). (C) Flow analysis of BrdU incorporation in CTRL and KO SSCs 24 hours after 0.5 Gy irradiation ( $n = 3$ ). (D) Effects of KU-60019 (ATM inhibitor at  $1\mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ), CHK2 inhibitor II hydrate (at  $50\mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ), VE-822 (ATR inhibitor at  $160\mu\text{M}$ ,  $n = 2$ ), and Rabusertib LY2603618 (CHK1 inhibitor at  $1\mu\text{M}$ ,  $n = 2$ ), on BrdU incorporation in wild type SSCs 24 hours after 0.5 Gy irradiation ( $n = 3$ ). (E) Effects of ATM inhibition on BrdU incorporation in CTRL and KO SSCs 24 hours after 0.5 Gy irradiation ( $n = 3$ ).

**Figure S1. Loss of DOT1L leads to an increased sensitivity to genotoxic stress**

(A) Microscopic observation of YFP fluorescence from 3-months old *Stra8-Cre.R26-stop-EYFP* mutant mice and wild type mice (Fig. S1A, B and C). (B) Flow cytometry analysis of YFP fluorescence in total testicular cells according to DNA content (Hoechst 33342 fluorescence), and in the  $\beta 2M^{-}\alpha 6^{+}KIT^{-}$  undifferentiated spermatogonia and  $\beta 2M^{-}\alpha 6^{+}KIT^{+}$  differentiating spermatogonia. Proportions are indicated in function of the parental gate. (C) Flow cytometry analysis of YFP fluorescence in the  $GFR\alpha 1^{+}PLVAP^{+}$  cells of the  $\beta 2M^{-}\alpha 6^{+}KIT^{-}$  undifferentiated spermatogonia. (D) Flow cytometry analysis of YFP fluorescence in hematopoietic CD45-positive cells from bone marrow and  $\beta 2M^{+}$  testicular somatic cells from *Stra8-Cre.R26-stop-EYFP* mice.

**Figure S2. Effects of aging on spermatogenesis in KO mice**

(A) Effects of aging on testicular weight, (B) sperm motility, (C) total testicular cell number (n=26 for CTRL; n=10 for KO) and (D) number of spermatocyte I (4N), spermatocyte II (2N) and spermatids (N) in old CTRL and KO testis (n=6).

**Table S1.** Frequency and number of spermatocytes I (4N), spermatocytes II (2N) and spermatids (N) in testis from CTRL and KO mice (frequency: n=10 for CTRL; n=6 for KO; cell number: n=8 for CTRL; n=6 for KO)



# Discussion



Les médecines régénératives basées sur la thérapie cellulaire, plus particulièrement les cellules souches germinales, sont d'un grand intérêt pour traiter les problèmes d'infertilité. Comme dans d'autres systèmes tissulaires de cellules souches, le pool de cellules souches spermatogoniales assure la spermatogenèse chez l'adulte par autorenouvellement et différenciation pour produire des spermatozoïdes. Une production efficace de spermatozoïdes fonctionnels après transplantation testiculaire a été rapportée chez des primates non humains (Hermann *et al.*, 2012). De même une autogreffe de tissu testiculaire chez les primates non humains prépubères a permis l'obtention de spermatozoïdes ainsi que d'une descendance (Jahnukainen *et al.*, 2012; Fayomi *et al.*, 2019). En France, les patients prépubères exposés à traitement hautement gonadotoxiques peuvent avoir recours à la préservation de la fertilité par cryopréservation de tissu testiculaire immature (TTI) dans le but de préserver les CSGs. Cependant, les TTI n'ont pour l'instant pas permis l'obtention d'une descendance. Les connaissances fondamentales sur les CSGs ont grandement bénéficié d'études chez *Caenorhabditis elegans* (Hubbard and Schedl, 2019), *Drosophila melanogaster* (Demarco *et al.*, 2014) et des modèles murins (Rooij, 2017). L'identité des CSGs est basée sur un modèle de division hiérarchique ou sur un modèle de fragmentation, qui est stochastique, où la population est équipotente en termes de souche permettant de réguler le pool de cellules souches. Toutefois, l'identité cellulaire et moléculaire des CSGs chez l'humain (adulte ou prépubère) et les mécanismes régulant leur capacité d'autorenouvellement et de différenciation sont encore peu connus. Comme nous l'avons vu, j'ai étudié les CSGs sous deux aspects afin de contribuer à une meilleure caractérisation de leur génotype et de leur fonction. Dans un premier temps, afin de mieux définir le phénotype des CSGs humaines, nous avons développé d'un panel de marqueurs de 14 couleurs permettant une caractérisation multiparamétrique à haut débit des cellules testiculaires par cytométrie spectrale, permettant de résoudre l'hétérogénéité des CSGs et progéniteurs germinaux humains. Dans un second temps, nous avons étudié l'impact d'une déficience de l'histone méthyltransférase DOT1L dans la physiologie des CSG dans un modèle murin. Outre son intérêt en tant que modulateur épigénétique et leur implication grandissante dans la régulation du destin des CSGs, DOT1L est une cible thérapeutique potentielle afin de traiter certains types de leucémies qui pourrait également impacter la fertilité chez les patients traités.

## 1) Préciser l'identité des cellules souches germinales humaines ?

Chez l'homme, le pool de cellules souches germinales et les mécanismes moléculaires régissant leur devenir sont encore mal compris. Cependant des études récentes de scRNAseq ont contribué de manière remarquable à définir différents états cellulaires des CSGs et de progéniteurs dans le pool de spermatogonies indifférenciées humaines (Guo *et al.*, 2018; Hermann *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Sohni *et al.*, 2019a; Shami *et al.*, 2020; Di Persio *et al.*, 2021). Le modèle prévalant chez l'Homme, qui reposait sur l'existence de deux populations de spermatogonies, les  $A_{\text{dark}}$  et les  $A_{\text{pale}}$  considérées respectivement comme le pool de cellules souches de réserve et comme le pool de cellules souches actives (Fayomi and Orwig, 2018), est maintenant largement remis en cause. En plus de ces études, qui ont mis en évidence une grande hétérogénéité dans la population des spermatogonies humaines, des études transcriptomiques ont montré également une similarité entre les spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  et  $A_{\text{pale}}$  (Jan *et al.*, 2017).

Cependant, ces approches sont limitées par l'impossibilité d'isoler ces sous-populations de cellules pour étudier leur fonction. L'approche multidimensionnelle du scRNAseq met néanmoins en évidence l'importance d'une analyse multiparamétrique à haute densité des marqueurs cellulaires dans des cellules individuelles, pour caractériser l'hétérogénéité du pool de spermatogonies avec une haute résolution. L'approche par cytométrie en flux et les développements récents tels que la cytométrie spectrale permettent la caractérisation multiparamétrique à haut débit de cellules individuelles en suspension. La cytométrie spectrale facilite la caractérisation du phénotype et de la fonctionnalité cellulaire, et la résolution de la complexité du pool de CSGs humaines, nécessaire au développement de nouvelles thérapies. A l'aide de la cytométrie spectrale nous avons développé un panel de marqueurs 14 couleurs afin de caractériser des différentes populations germinales. Notre étude fournit des informations dévoilant une hétérogénéité des cellules spermatogoniales humaines d'une manière non délétère pour l'intégrité et la viabilité des cellules.

Le développement de la cytométrie de masse et de la cytométrie spectrale a permis de définir plus précisément l'hétérogénéité cellulaire dans des systèmes biologiques complexes. Ces techniques permettent de collecter simultanément sur des cellules uniques un grand nombre de données issues du phénotypage cellulaire. La cytométrie spectrale

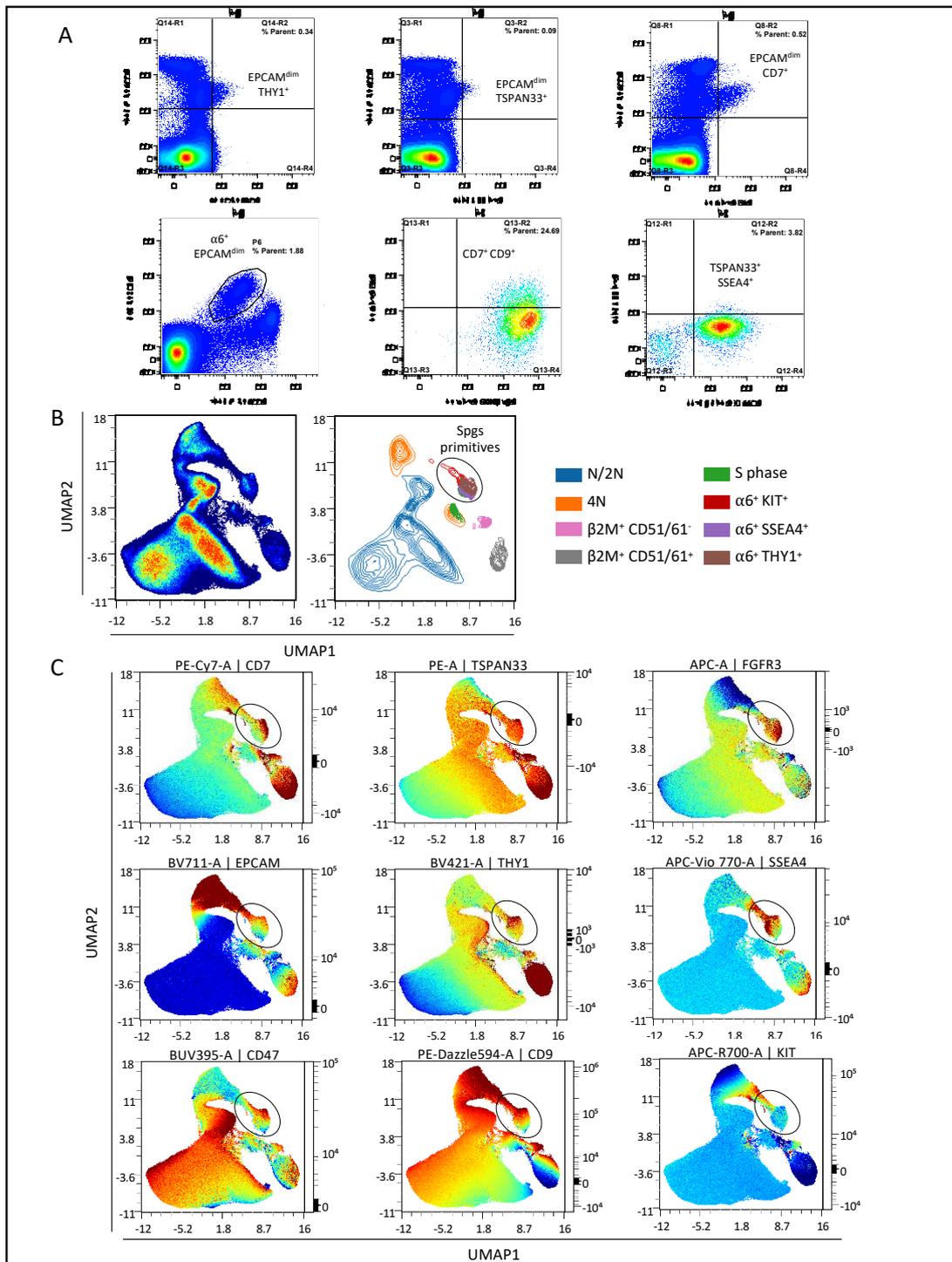
permet d'analyser des populations de cellules rares dans des échantillons complexes. L'avancée technologique de la cytométrie spectrale réside dans sa capacité à réaliser un échantillonnage à haute résolution du spectre de fluorescence, grâce notamment à un développement de la partie optique et l'utilisation de détecteurs à semi-conducteurs (photodiodes à avalanche -APD). Ceci permet de recueillir l'ensemble du spectre émis par un fluorochrome lors de son passage devant les faisceaux laser. Une décomposition linéaire algorithmique permet de déduire ensuite pour chaque cellule la contribution de chaque marqueur fluorescent à partir de l'empreinte spectrale de l'échantillon multi-marqué se basant sur la signature spectrale de référence de chaque fluorochrome utilisé. Après décomposition spectrale, les données obtenues peuvent être analysées comme en cytométrie classique. La cytométrie spectrale présente deux grands avantages en termes de sensibilité : d'une part, la discrimination de sondes avec un recouvrement spectral important, et d'autre part, la détection et la prise en compte comme paramètre de l'autofluorescence des cellules. Les renseignements obtenus pour chaque cellule, sur un nombre important de paramètres, ont également conduit à la conception de nouveaux outils et algorithmes de calcul pour l'exploration des données, facilitant la visualisation des données et l'extraction des corrélations statistiques. Ces outils reprennent les méthodes d'analyse du scRNAseq : algorithmes pour la réduction de la dimensionnalité, tels que l'incorporation de voisins stochastiques distribués en t (t-SNE), l'approximation et la projection uniformes de variétés (UMAP) et les outils de regroupement/clusterisation, notamment FlowSOM et PhenoGraph pour caractériser les sous-populations cellulaires (Ferrer-Font *et al.*, 2020; Do and Canzar, 2021).

Notre panel de 14-C permet de générer un profil complet des CSGs humaines et des progéniteurs spermatogoniaux par cytométrie spectrale en flux. Le criblage de différents marqueurs membranaires, décrits dans différents types de cellules souches, a permis d'identifier de nouveaux marqueurs des CSGs tels que CD47, CD7, CD148, CD155. La combinaison des 14 marqueurs nous a permis de caractériser un état de CSGs primitives avec le phénotype  $\beta$ -2M<sup>-</sup>CD51/61<sup>-</sup> $\alpha$ 6<sup>+</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup> CD148<sup>+</sup>CD47<sup>high</sup> CD7<sup>high</sup>. En analysant les sous-populations spermatogoniales, une hiérarchie est suggérée dans le processus de différenciation avec une transition d'un état primitif  $\alpha$ 6<sup>+</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>+</sup>THY1<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup>CD148<sup>+</sup>CD47<sup>high</sup>CD7<sup>high</sup> à un état  $\alpha$ 6<sup>+</sup>SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup>

THY1<sup>+</sup>CD130<sup>+</sup>CD155<sup>+</sup>CD148<sup>+</sup>CD47<sup>+</sup>CD7<sup>low/med</sup>. Les cellules FGFR3<sup>+</sup> se trouvent entre ces deux clusters, suggérant une étape de transition. Ces cellules se différencient ensuite dans un état plus différencié SSEA4<sup>+</sup>TSPAN33<sup>-</sup>THY1<sup>-</sup>CD148<sup>-</sup>CD7<sup>-</sup>KIT<sup>+</sup>. L'expression de KIT constitue alors une transition vers le troisième groupe de spermatogonies  $\alpha 6^{\text{med}}$ SSEA4<sup>-</sup> différenciées plus avancées, caractérisées notamment par une forte expression de CD130 et CD155.

Nous montrons que CD47, CD155, CD148 et CD7 sont exprimés dans les populations de spermatogonies primitives humaines, interrogeant sur leur rôle potentiel dans la physiologie des CSGs. Le rôle principal de la protéine transmembranaire CD47 semble être de protéger les cellules de la phagocytose. Lorsque CD47 est liée à la protéine régulatrice- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) exprimée sur les macrophages et les cellules dendritiques, elle inhibe le processus de phagocytose (Willingham *et al.*, 2012). Cela permet par exemple aux cellules souches hématopoïétiques mobilisées de se protéger de la phagocytose en modulant l'expression de CD47 (Jaiswal *et al.*, 2009). Les macrophages résidentiels testiculaires sont retrouvés à la surface des tubes séminifères, au niveau externe de la membrane basale. Une expression élevée de CD47 par les CSGs leur permettrait de se protéger contre la phagocytose potentielle par ces macrophages. CD155, initialement identifiée comme PolioVirus Receptor (PVR), est une molécule de la superfamille des immunoglobulines impliquée dans de nombreux processus physiologiques médiant les interactions intercellulaires ou l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire et la migration cellulaire (Molfetta *et al.*, 2020). La protéine tyrosine phosphatase CD148, régule négativement l'action des facteurs de croissance et de la prolifération cellulaire (Mori *et al.*, 2018; Zhu, 2018). Plus particulièrement CD148 module l'expression du récepteur FGF (FGFR), les protéines kinases ERK1/2 ainsi que les protéines de la famille Src (SKF) (Takahashi *et al.*, 2012). Ces protéines sont impliquées dans des voies moléculaires nécessaires à la régulation du destin des CSGs (Ishii *et al.*, 2012; Masaki *et al.*, 2018). Enfin, CD7 est une protéine associée aux lymphocytes T matures, mais aussi un marqueur de nombreuses cellules souches cancéreuses. Cependant le rôle du CD7 reste méconnu.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des CSGs humaines et des progéniteurs spermatogoniaux, nous avons récemment incrémenté le panel 14-C de deux nouveaux marqueurs, EPCAM et CD9, deux marqueurs des CSGs (Hermann *et al.*, 2018; Givelet *et al.*, 2022). Ces résultats préliminaires sont présentés (Figure 23).

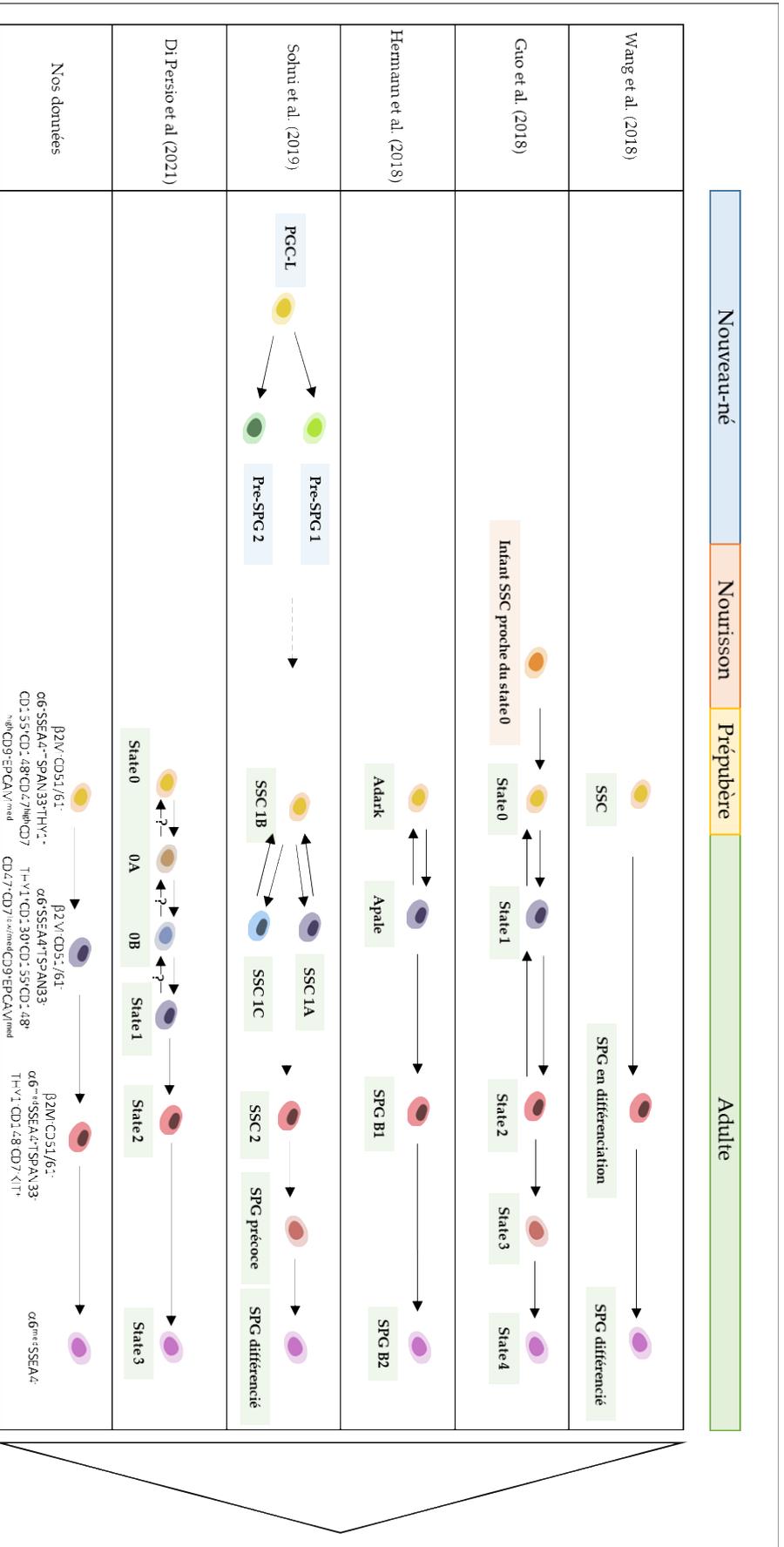


**Figure 23 : Analyse multidimensionnelle du panel 16-C**

(A) Graphiques des analyse de cytométrie en flux des progéniteurs spermatogoniaux humain selon les paramètres EPCAM, SSEA4, TSPAN33, THY1 et CD9. (B) Analyse UMAP selon différentes sous-populations définies dans l'article 1 de cette thèse. La population de spermatogonies primitives (spgs primitives) est indiquée sur la figure (C) Expression individuelle des marqueurs de spermatogonies superposés à la représentation UMAP des cellules testiculaires humaines.

L'expression de THY1, TSPAN33 et CD7 est observée dans les cellules EPCAM<sup>med</sup>. La population de spermatogonies  $\alpha 6^+$  montrant une expression moyenne d'EPCAM contient des cellules coexprimant CD9, CD7, SSEA4 et TSPAN33 (Figure 23A). Les représentations UMAP de ce panel 16-C étendu ont confirmé que les cellules  $\beta 2 M^- CD 51 / 61^- \alpha 6^+ THY 1^+ SSEA 4^+ TSPAN 33^+$ , avec l'expression la plus élevée des marqueurs CD47, CD7, exprimaient également CD9 et EPCAM (Figure 23B et C). Ces cellules montrent également l'expression de CD148 et de CD155 (données non présentées). Ainsi, nous définissons une population de CSGs primitives avec le phénotype  $\beta 2 M^- CD 51 / 61^- \alpha 6^+ SSEA 4^+ TSPAN 33^+ THY 1^+ CD 155^+ CD 148^+ CD 47^{high} CD 7^{high} CD 9^+ EPCAM^{med}$ .

TSPAN33, SSEA4, EPCAM, CD9, l'intégrine  $\alpha$ -6, THY1, EPCAM et PLPPR3 sont des marqueurs des cellules spermatogoniales possédant un potentiel de repopulation après transplantation (Izadyar *et al.*, 2011; Hermann *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2020; Givelet *et al.*, 2022). Il convient de noter que la population de CSGs que nous avons identifiée exprime ces marqueurs. De plus, cette population de CSGs TSPAN33<sup>+</sup> exprime également CD47 à un niveau plus élevé que la population TSPAN33<sup>-</sup>. L'expression de CD47 a été décrite comme étant enrichie dans le transcriptome de la population de CSGs PLPPR3<sup>+</sup> ou de la population SP $\beta 2 M^- \alpha 6^+ THY 1^+$  qui présentent un potentiel de régénération après transplantation (Tan *et al.*, 2020; Givelet *et al.*, 2022). Les analyses de scRNAseq ont quant à elles permis de distinguer des sous-population au sein des spermatogonies humaines. Guo et ses collègues font état de quatre stades différents. Le « stade 0 » correspondrait au stade le plus primitif des spermatogonies, il s'agit d'une population de réserve qui est quiescente (Guo *et al.*, 2018). De même Sohni et ses collègues parlent d'un stade SSC1-B, analogue au stade 0, comme étant le stade le plus primitif (Sohni *et al.*, 2019a). CD47 est retrouvé comme marqueur de ces deux stades. La co-expression de l'expression de TSPAN33 et de CD47, ainsi que de PIWIL4, C19orf84, PLPPR3 et UTF1, dans cette sous-population de CSGs, représentant environ 0,13 % des populations germinales, suggère qu'elle correspond aux stades primitifs 0 et SSC1-B des CSGs. La population avec le phénotype  $\beta 2 M^- CD 51 / 61^- \alpha 6^+ SSEA 4^+ TSPAN 33^+ THY 1^+ CD 155^+ CD 148^+ CD 47^{high} CD 7^{high} CD 9^+ EPCAM^{med}$  correspondrait aussi au stade 0 de la hiérarchie spermatogonale (Figure 24) définie par analyse scRNAseq comme TSPAN33<sup>+</sup>SSEA4<sup>dim</sup> (Guo *et al.*, 2018).



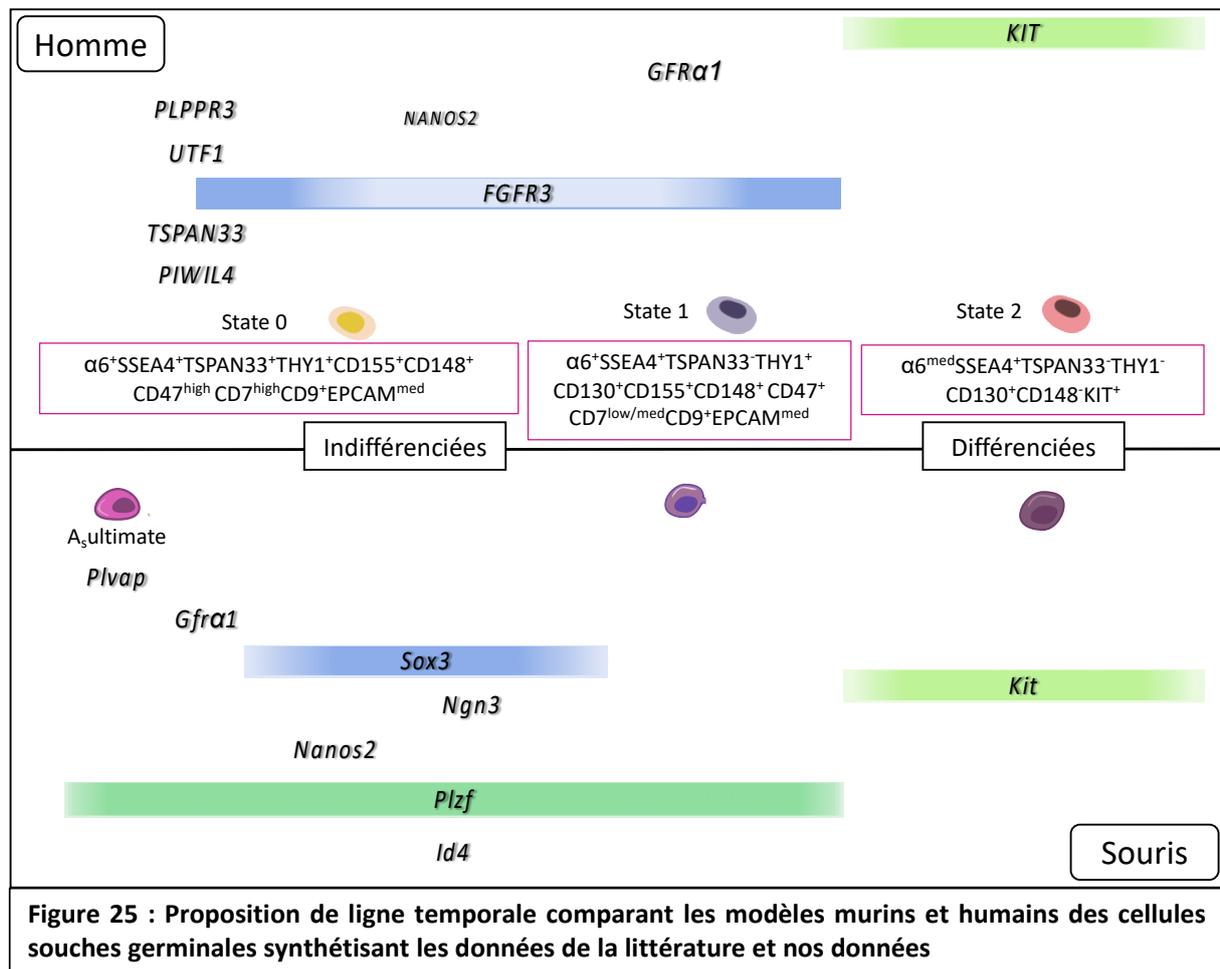
**Figure 24 : Autorenewellement et différenciation des CSGs humaines**  
 Nos données sont en accord avec l'hypothèse de la hiérarchie de différenciation commençant par le state 0.

Un marqueur intéressant à ajouter à notre panel serait GFR $\alpha$ 1. Contrairement au modèle murin, où l'on retrouve ce marqueur au sommet de la hiérarchie de différenciation, il est décrit chez l'humain une petite population GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> au sommet. Cette population est transcriptionnellement distincte d'une autre population de spermatogonies plus différenciées GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> située en aval de la population GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> (Guo *et al.*, 2018). Cette sous-population de cellules GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> pourrait constituer une population de réserve de cellules dormantes décrit dans le modèle classique des spermatogonies A<sub>dark</sub>. Nous n'avons pas réussi pour l'instant à ajouter ce marqueur à notre panel, ainsi que le marqueur PLPPR3, les anticorps utilisés ne permettant pas de détecter ces récepteurs dans nos conditions d'analyse.

D'autre part, il est intéressant de noter que PIWIL4/MIWI2 est un marqueur de la sous-population de CSGs la plus immature chez l'homme. Ces cellules seraient au sommet de la hiérarchie de la différenciation des cellule souches. Au contraire chez la souris, MIWI2 est un marqueur des spermatogonies indifférenciées engagées en différenciation NGN3<sup>+</sup>. Ces progéniteurs murins sont impliqués dans la régénération tissulaire lorsque la spermatogenèse est altérée, induisant une dédifférenciation des cellules progénitrice vers un état souche afin de restaurer le pool de CSGs. Cependant, ils sont très peu impliqués dans la régulation de la population de CSGs en condition normale homéostatique. Cela pourrait souligner des divergences importantes entre les modèles de CSGs humaine et murines, et/ou souligner un rôle plus important de la réversibilité des progéniteurs humains vers un état souche dans le maintien des CSGs humaines en homéostasie (Carrieri *et al.*, 2017; Nakagawa *et al.*, 2021). Nous proposons une comparaison des modèles murins et humains de CSGs selon l'expressions des marqueurs des différentes populations de spermatogonies identifiées (Figure 25).

La cytométrie en flux spectrale permet l'étude de la dynamique d'expression des marqueurs des CSGs humaines au sein d'une population complexe. Dans de futures études, la combinaison d'un plus grand nombre de biomarqueurs et de nouvelles approches en bioinformatique devrait aider à combler les lacunes dans les connaissances sur l'identification des CSGs primitives humaines, permettant une meilleure hiérarchisation des états successifs des CSGs. Ce travail fournit des informations sur l'hétérogénéité du pool spermatogonial humain grâce à une méthode non délétère pour l'intégrité et la viabilité des cellules,

permettant de futures études de leur fonctionnalité, ce qui constitue un atout pour une caractérisation précise des populations de spermatogonies et de l'état souche.



N'ayant pas réalisé de test fonctionnel par transplantation des populations de cellules souches candidates, notre étude présente ainsi des limites. En effet nous avons utilisé un analyseur spectral ne permettant pas de purification des cellules. Cependant, des cytomètres trieurs basés sur cette technologie, viennent d'être développés et mis sur le marché permettant ainsi de purifier et tester les populations candidates par différents tests fonctionnels. Compte tenu de la faible représentativité des populations de cellules souches, un problème de rendement de cellules obtenues (500 à 1000 cellules TSPAN33+ par biopsie testiculaire par exemple) peut être contraignant pour des études de transplantation ou des études transcriptomiques. Cela pourrait nécessiter de travailler à partir d'un pool de biopsies ou sur des fragments plus importants dans le cadre de don d'organes. Ce point sera d'autant

plus limitant pour des études sur des patients prépubères. D'autre part une des perspectives serait d'associer les analyses spectrales de notre panel de marqueurs à une analyse par transcriptomique spatiale de ce même panel (Ståhl *et al.*, 2016; Rodriques *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021). En effet, cette technologie permettrait d'établir la cartographie de ces cellules dans une coupe histologique de testicule et ainsi de préciser leur localisation au niveau de la niche testiculaire et de mieux définir celle-ci.

## 2) DOT1L : un nouvel acteur épigénétique de la maintenance et de la différenciation des CSGs

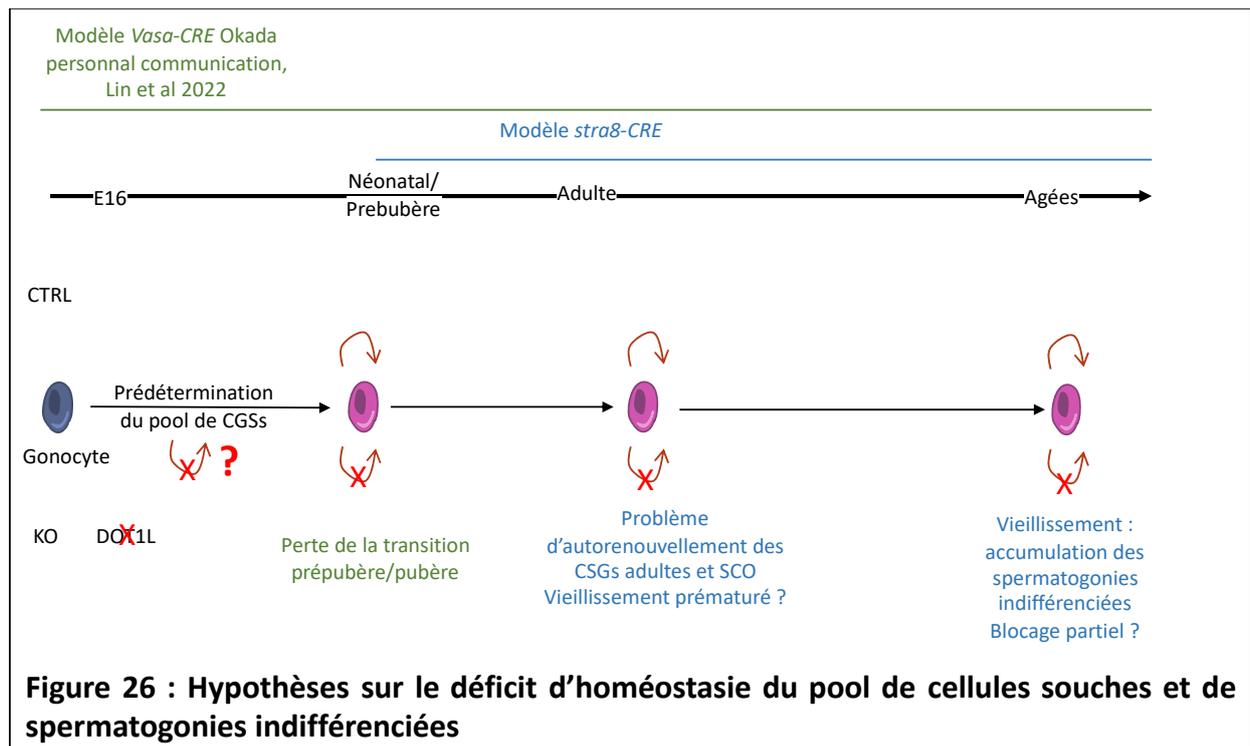
Notre modèle d'inactivation conditionnelle *Stra8-Cre* chez la souris en postnatal montre que *Dot1l* est nécessaire pour maintenir la spermatogenèse à long terme, contrairement à ce qui est observé pour l'ovogenèse (Liao and Szabó, 2020). La suppression de *Dot1l* conduit à un problème d'homéostasie de la spermatogenèse et à la perte de CSGs fonctionnelles lié à un défaut intrinsèque. Au cours de cette année en juin 2022, un travail sur le rôle DOT1L dans la spermatogenèse a été publié utilisant un modèle différent de souris KO conditionnelle, le modèle *Vasa-Cre* présentant un timing d'inactivation de *Dot1l* plus précoce au cours de la vie foetale que notre modèle *Stra8-Cre* (Lin *et al.*, 2022). Leur étude montre un rôle essentiel de DOT1L dans l'ontogenèse des CSGs. Ils ont également utilisé un modèle *Vasa-Cre<sup>ERT2</sup>* inducible par le tamoxifène pour étudier les effets de *Dot1l* sur les CSGs adultes. Une réduction de la spermatogenèse a été observée, ainsi que du nombre de spermatogonies SALL4<sup>+</sup> 35 jours après l'induction au tamoxifène, mais aucune donnée n'est présentée à des temps plus tardifs pouvant montrer un effet sur le maintien des CSGs adultes. Dans mon travail de thèse, nous allons plus loin dans la description et la compréhension des défauts survenant dans la population de spermatogonies indifférenciées. Nous tirons des conclusions similaires quant au rôle crucial de DOT1L dans les CSGs, cependant nous observons également d'autres phénotypes et nos données permettent de préciser le rôle de DOT1L dans l'ontogenèse, le maintien des CSGs adultes, et l'homéostasie de la population de spermatogonies indifférenciées.

La taille du pool de CSGs GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> est en effet fortement réduite dans les souris adultes KO. Nous avons également observé un problème de différenciation en spermatogonies indifférenciées GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup> chez les souris KO. Il est à noter que les souris CTRL âgées présentent le même phénotype que les jeunes souris KO, suggérant qu'un vieillissement prématuré du pool de spermatogonies indifférenciées pourrait se produire chez les souris KO. De plus, nous notons une diminution de la fonctionnalité des CSGs KO (capacité à former des colonies in vitro, défaut du potentiel de régénération après transplantation testiculaire). DOT1L a été

décrit comme constituant une barrière à la reprogrammation des cellules somatique chez les iPS (Onder *et al.*, 2012). Pour autant, nous n'observons pas d'événements de reprogrammation spontanée des CSGs KO en cellules pluripotentes au cours de nos cultures de CSGs. Les CSGs KO présentent également *in vitro* une sensibilité accrue au stress génotoxique. Chez les souris KO âgées, le défaut de fertilité est particulièrement aggravé avec l'âge, et nous avons détecté chez ces souris un phénotype supplémentaire, à savoir l'accumulation de spermatogonies indifférenciées. Ainsi, l'homéostasie de la population de spermatogonies indifférenciées contenant les CSGs est altérée chez les souris KO jeunes et âgées.

#### DOT1L CSGs : un problème à la mise en place du futur pool de CSGs adulte chez la souris néonatale/prépubère et sur l'homéostasie de la population de spermatogonies indifférenciées chez l'adulte ?

Un effet dramatique de la déficience de *Dot1l* sur le pool de CSGs adultes et la fertilité est observé dans le modèle KO conditionnel *Vasa-Cre* lorsque l'inactivation de *Dot1l* débute dès la vie fœtale dans la lignée germinale (Lin *et al.*, 2022) Yuki Okada, *personal communication*). Une absence de spermatogonies SALL4<sup>+</sup>, un marqueur des spermatogonies indifférenciées, est notamment décrite dans les tubules des souris adultes de 40 jours (Lin *et al.*, 2022). Le phénotype que nous observons dans le modèle KO conditionnel *Stra8-Cre* est moins drastique, bien que le pool de CSGs soit sévèrement affecté. Dans ce modèle, la CRE est exprimée au cours de la période néonatale/prépubère, dès J3-J5 lorsque les CSGs prépubères se différencient pour établir les fondateurs du futur pool de CSGs adultes. Dans notre modèle, le phénotype observé est une conséquence à la fois de l'impact sur la mise en place du pool de CSGs adulte en période néonatale/prépubère et de l'autorenouvellement des CSGs chez l'adulte. Dans l'ensemble, ces données suggèrent un rôle plus critique de *Dot1l* à la période néonatale/prépubère, lorsque le pool définitif de CSGs adultes est établi, qu'au cours de la vie adulte pour le maintien de l'homéostasie à long terme du pool de CSGs (Figure 26).



Ces observations indiquent également que l'inactivation de DOT1L doit se produire longtemps avant la période de transition des CSGs prépubères en CSGs adultes (J3-7), une coupure dans le gène *Dot1l* avant la phase de transition étant plus délétère sur les CSGs qu'une coupure pendant cette phase. Ces observations sont à rapprocher du modèle de pré-détermination des futures CSGs au cours de la vie fœtale et néonatale. Comme nous l'avons vu dans l'Introduction, le destin postnatal serait programmé pendant cette période entre E16,5 et la naissance (Helsel *et al.*, 2017; Law and Oatley, 2020). Deux sous-populations de gonocytes quiescents sont décrits: une sous-population exprimant notamment les gènes *Etv5*, *Id4*, *Gfra1*, *Lhx1* et *Ret* marqueurs des CSGs, et qui possède un potentiel souche, et une sous-population exprimant des gènes associés aux progéniteurs ou à la différenciation (Helsel *et al.*, 2017; Law and Oatley, 2020). Après la naissance, la sous-population exprimant *Id4* constitue la population fondatrice des futures CSGs adultes, la deuxième sous-population étant chargée d'assurer le premier cycle de spermatogenèse. Ainsi, l'effet plus important d'une déficience de *Dot1l* sur le lignage germinal dans le modèle *Vasa-Cre* pourrait provenir d'une altération dans ce programme de pré-détermination de la sous-population cellulaire chargée de générer le futur pool de CSGs adulte au cours de la vie fœtale et néonatale. La possibilité de l'implication de DOT1L, modulateur épigénétique régulant la méthylation de la

marque H3K79, sur la pré-détermination et sa persistance n'est pas surprenant. En effet, les marques épigénétiques sont impliquées dans le maintien de la régulation génique transmise lors des divisions cellulaires et dans le maintien du destin des cellules dans le processus de différenciation. Dans le modèle de pré-détermination, une hypothèse est que le destin des différentes sous-population cellulaires soit contrôlé par l'apposition de marques épigénétiques au niveau des séquences *enhancers* des gènes clés du potentiel souche et de la différenciation. Le niveau de méthylation de la marque H3K79 pourrait ainsi réguler de manière fine la répression ou l'induction de ces gènes au cours de l'ontogenèse. Des études de la présence de la marque H3K79 au niveau des séquences *enhancers* des gènes de potentiel souche devront être menées afin de préciser le rôle de la marque sur le destin de ces cellules au cours de la vie fœtale, néonatale et prépubère. L'hypothèse que l'inactivation de DOT1L doit se produire longtemps avant la transition des CSGs prépubères en CSGs adultes pourrait également suggérer que la perte de la marque H3K79me<sub>2-3</sub>, s'effectuant principalement par dilution au cours des divisions cellulaires, serait le facteur critique pour l'établissement des CSGs adultes au stade néonatal/prépubère. De nouvelles études, en ciblant par exemple uniquement l'activité méthyltransférase de DOT1L, seront nécessaire afin de déterminer si DOT1L intervient directement dans la régulation de ces processus, ou si les défauts observés sont directement liés à la perte de la marque, conséquence de l'inactivation de *Dot1l*. Néanmoins, notre modèle de KO conditionnel *Stra8-Cre* montre également le rôle important de *Dot1l* dans la mise en place du futur pool de CSGs adulte chez la souris prépubère et sur l'homéostasie de la population de spermatogonies indifférenciées chez l'adulte.

Pendant la période néonatale/prépubère, les CSGs prépubères NGN3<sup>+</sup> établissent la future population de CSGs adultes. Il convient de noter que le pool de futurs CSGs adultes doit passer par l'état exprimant *Ngn3* à cet âge (Yoshida *et al.*, 2006). Or, nous avons observé un problème de différenciation des spermatogonies indifférenciées GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup>PLVAP<sup>-</sup> au stade GFR $\alpha$ 1<sup>-</sup>, qui correspondent au spermatogonies NGN3<sup>+</sup>, dans notre modèle de souris KO adulte. Par conséquent, le passage des CSGs par le stade exprimant *Ngn3* chez le prépubère pourrait être l'étape critique bloquant l'ontogenèse du pool de CSGs adultes dans le contexte de déficience de *Dot1l*. Ce point nécessitera des investigations ultérieures.

## La déficience de DOT1L et son impact sur le programme transcriptionnel des CSGs : des conséquences différentes sur le programme transcriptionnel des CSGs prépubères et adultes ?

Les niveaux de méthylation de H3K79 sont considérés comme corrélés à un profil de transcription active. Cette corrélation suggère qu'une déficience de DOT1L peut entraîner des changements importants du programme transcriptionnel, notamment sur les gènes activement exprimés. Dans le RNAseq sur les spermatogonies indifférenciées  $\alpha6^+KIT^-$  adultes, nous n'avons observé que 312 gènes dérégulés dans les KO par rapport aux CTRL (171 dont l'expression diminue et 159 dont l'expression augmente), sur les 17000 gènes détectés. Les gènes marqueurs des CSGs ne semblent pas dérégulés, tels que *Gfra1*, *Ret*, *Id4*, *Eomes*, *Nanos2*, *Pdx1*, *Lhx1*, *Foxc2*, *T*, *Shisa6*, *Egr2*, *Upp1*, *Sox3*, *Sox2*, and *Sall4*. D'autre part, nos résultats montrent que la perte d'activité de DOT1L a des impacts différents au niveau transcriptionnel entre les CSGs adultes et les CSGs néonatales/prépubères. En effet les transcriptomes des spermatogonies indifférenciées KO adultes et prépubères ne présentent pas de similarité (Okada, *personal communication*). Des résultats identiques sont obtenus quand il est comparé avec le profil d'expression de spermatogonies prépubères traitées avec un inhibiteur de DOT1L en culture (Lin *et al.*, 2022). Notamment, l'équipe de Wang a récemment rapporté que DOT1L jouait un rôle dans la transcription du cluster des gènes homéotiques, dont *HoxC* dans les CSGs (Lin *et al.*, 2022). Nous n'avons cependant pas observé de variations de l'expression des gènes *Hox* dans le transcriptome KO adulte. La perte d'activité DOT1L a donc des impacts différents au niveau transcriptionnel sur les CSGs en fonction du stade de développement. Cela pourrait en effet contribuer aux effets différents qui sont observés sur les CSGs prépubères et adultes déficientes pour DOT1L.

Nous avons observé une expression accrue de *Bhlhe40* chez les souris KO, un facteur répresseur de transcription qui est régulé par le GDNF dans les CSGs de rat (Schmidt *et al.*, 2009). Il a été montré que *Bhlhe40* régule le nombre de CSGs en culture, suggérant un rôle dans le maintien de leur état indifférencié. Chez la souris, *Bhlhe40* est nécessaire à l'auto-renouvellement et au maintien d'un type de macrophage (Jarjour *et al.*, 2019). Un rôle potentiel de *Bhlhe40* dans le défaut de différenciation et d'homéostasie des spermatogonies indifférenciées, avec notamment une accumulation de ces cellules dans les souris KO âgées, nécessitera de futures investigations. Malgré le rôle de H3K79me2-3 en tant que marqueur de

transcription active, la contribution d'une dérégulation transcriptionnelle globale ou spécifique de certains gènes aux phénotypes observés dans les CSGs déficientes pour *Dot1l* reste à être déterminée, mais reste questionnable au vu de nos résultats. Pour aller plus loin, nous avons réalisé des expériences de CHIP-seq sur la marque H3K79me2 dans les CSGs. Nous n'avons pas réussi à obtenir des données sur des pools de 200 000 à 300 000 spermatogonies indifférenciées purifiées par cytométrie en flux, du fait d'un problème de sensibilité de la technique pour cette marque. Afin de contourner ce problème de sensibilité, des études de CHIP-seq de la marque H3K79me2 sur des CSGs en culture (1,5 million de cellules par point) sont en cours afin de déterminer les régions enrichies dans cette marque après stimulation au GDNF, facteur essentiel à l'autorenouvellement des CSGs.

#### Un phénotype particulier lié au vieillissement des souris KO *Dot1l*: l'accumulation des spermatogonies indifférenciées

Notre modèle de souris KO conditionnelle *Stra8-Cre* nous a permis d'observer le phénotype d'accumulation des spermatogonies indifférenciées lié au vieillissement. Ce phénotype pourrait d'abord apparaître contre-intuitif. En effet, une diminution du pool de cellules souches est détectée chez les souris adultes jeunes, alors qu'une accumulation de la population de spermatogonies indifférenciées est observé dans les souris de plus d'un an. Une baisse progressive du pool de cellules souches serait attendue avec le vieillissement si la déficience de *Dot1l* n'affectait que le renouvellement des cellules souches. Un phénotype similaire a été récemment observé dans un modèle KO de DMNT3A, qui participe à la régulation de la méthylation de l'ADN (Dura *et al.*, 2022). Le phénotype associé au vieillissement observé dans le modèle KO de DOT1L rappelle également les défauts de développement observés dans le modèle murin déficient pour le facteur de transcription DMRT1, à savoir l'accumulation de spermatogonies indifférenciées et la diminution de la population de spermatogonies en différenciation (Zhang *et al.*, 2016). D'une part, DMRT1 est en effet nécessaire au cours de la période néonatale/prépubère pour l'ontogenèse des cellules souches germinales, comme dans les modèles *Vasa-Cre* et *Stra8-Cre* de *Dot1l*. D'autre part, un engagement précoce en méiose des spermatogonies indifférenciées déficientes pour DMRT1 a été décrit, qui détourne les progéniteurs de l'étape d'amplification et de différenciation des spermatogonies KIT<sup>+</sup> (Zhang *et al.*, 2016). Dans ce modèle, une activation

anormale de la signalisation de l'acide rétinoïque a été décrite dans la population de spermatogonies indifférenciée qui pourrait expliquer ce problème de différenciation. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin d'étudier l'implication d'une dérégulation de l'acide rétinoïque chez les souris âgées déficientes pour DOT1L. Des études sur l'expression de STRA8 dans les spermatogonies indifférenciées PLZF<sup>+</sup> et l'analyse du transcriptome des spermatogonies indifférenciées sont en cours. Bien que le développement des cellules germinales ne soit pas bloqué, le fait de contourner l'étape d'amplification de la différenciation des spermatogonies peut contribuer à la réduction du nombre de cellules germinales observée chez les souris KO DOT1L âgées.

#### DOT1L et la réponse aux dommages à l'ADN dans les CSGs ?

La méthylation de H3K79 médiée par la méthyltransférase *Dot1* chez la levure est impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN et l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (Wysocki *et al.*, 2005). Des études sur des cellules de mammifères ont également montré qu'une déficience en DOT1L augmente la sensibilité aux rayonnements ionisants et UV (Zhu *et al.*, 2018). Les CSGs KO montrent *in vitro* une sensibilité accrue au stress génotoxique tel que l'irradiation  $\gamma$  ou l'exposition à l'agent pontant de l'ADN, la mitomycine C (test *in vitro* de leur capacité à former des colonies). Cette radiosensibilité accrue des CSGs KO n'est pas associée à une génération plus élevée de dommages à l'ADN (analyse des foyers  $\gamma$ H2AX). Il a été rapporté précédemment que le recrutement de 53BP1 sur les sites de dommages à l'ADN se produit via la liaison à H3K79 méthylé (Wakeman *et al.*, 2012). Cependant, nous n'avons pas détecté de changements dans la formation de foyers de 53BP1 dans les CSGs KO irradiées. Ceci est en accord d'autres données montrant que H4K20me<sub>2</sub>, et non H3K79, serait nécessaire au recrutement de 53BP1 (Jacquet *et al.*, 2016). Une analyse du cycle cellulaire (pulse de BrdU de 2h) 24 h après irradiation des CSGs KO a révélé une altération du point de contrôle G1/S lorsque DOT1L est déficient. *Dot1* a déjà été décrit pour réguler chez la levure le point de contrôle G1/S, grâce à son activité lysine méthyl transférase et l'apposition de la marque H3K79 (Wysocki *et al.*, 2005).

Dans les cellules en phase G1, les mécanismes de contrôle de la réponse aux dommages à l'ADN peuvent passer par les voies ATM/CHK2 et ATR/CHK1 (Li *et al.*, 2021). Ces voies conduisent à la phosphorylation et à la stabilisation de p53. p21, cible transcriptionnelle

de p53, permettra l'arrêt du cycle en G1 en inhibant les complexes CDK2-cycline E. Une autre voie de signalisation via la phosphorylation et la dégradation de Cdc25A peut médier un arrêt plus rapide du cycle en G1, le point de contrôle dépendant de p53 prenant le relais au bout de quelques heures (Mailand *et al.*, 2000). Nous avons observé le défaut d'arrêt en G1/S dans les CSGs KO 24 h après irradiation à 0,5 Gy, et non dans les premières heures, correspondant à la réponse tardive du checkpoint G1/S. Fait intéressant, nous avons constaté que la voie de signalisation de la kinase ATM-CHK2 est principalement responsable de l'arrêt G1/S des CSGs sauvages après irradiation. De plus, les effets de l'inhibition d'ATM et de la perte de *Dot1l* n'étaient pas additifs sur l'arrêt G1/S des CSGs irradiées, suggérant que DOT1L et ATM se trouvent sur la même voie moléculaire. Une étude est en cours afin d'étudier si l'activation d'ATM via l'analyse de sa phosphorylation est altérée dans les CSGs KO DOT1L après irradiation (détection des formes phosphorylées d'ATM). Il serait également intéressant de déterminer si une augmentation des dommages ADN résiduels non réparés est observée dans les CSGs KO qui continuent à cycliser 24 h après irradiation (mesure des foci  $\gamma$ H2AX), et son lien potentiel avec une mort différée des CSGs. ATM a récemment été décrit comme étant le principal régulateur du point de contrôle G1 après une exposition à de faibles doses d'irradiation, tandis que ATM et ATR pourraient être impliqués dans le point de contrôle à forte dose (Li *et al.*, 2021). Comme les CSGs ont été irradiés à 0,5 Gray, le rôle d'ATM dans l'arrêt G1/S que nous avons observé est logique.

La manière dont DOT1L, ou H3K79me<sub>2-3</sub>, pourrait interagir avec ATM reste inconnue. La détection de la marque H3K79me<sub>2-3</sub> ou de DOT1L au niveau de stries de dommages à l'ADN dans les noyaux de CSGs, après micro-irradiation laser, permettrait de voir s'il y a mobilisation de ces évènements moléculaires au niveau des dommages. Des expériences de co-immunoprécipitations avec DOT1L devront également être menées dans les CSGs afin de voir si ATM interagit directement avec DOT1L. L'activation d'ATM implique une cascade d'évènements, dont l'acétylation par TIP60 et l'autophosphorylation. La régulation de la forme active d'ATM via l'acétylation pourrait être une hypothèse du rôle de DOT1L dans la modulation de l'activité d'ATM. Les sirtuines, homologues de la protéine de levure Sir2 chez les mammifères, sont des histone désacétylases dépendantes de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>), qui régulent diverses fonctions cellulaires et biologiques, notamment le vieillissement, le métabolisme, la stabilité génomique et la tumorigenèse. Parmi les sept

membres des protéines de la famille des sirtuines, SIRT1, SIRT6 et SIRT7 sont principalement localisés dans le noyau et régulent la réponse et la réparation des dommages à l'ADN (Meng *et al.*, 2020). Une activité accrue de la désacétylase SIRT1 a été rapportée dans les cellules déficientes en DOT1L (Chen *et al.*, 2015), ce qui pourrait contribuer à maintenir ATM sous sa forme désacétylée inactive dans les cellules KO après irradiation, empêchant l'arrêt de G1/S. Il a été récemment décrit que la désacétylation médiée par la sirtuine 7 (SIRT7) est essentielle pour la déphosphorylation et la désactivation d'ATM (Tang *et al.*, 2019). Même si le mécanisme d'action reste encore inconnu, l'implication de DOT1L dans la réponse aux dommages de l'ADN met en évidence le rôle clé que joue cette enzyme dans l'intégrité génomique et la stabilité des CSGs.

Afin d'aller plus loin, la sensibilité des CSGs déficientes pour DOT1L (souris KO ou souris traitées avec un inhibiteur de DOT1L) pourrait être évaluée *in vivo* après irradiation des souris (1-2Gy), par la mesure du nombre de spermatogonies indifférenciées GFR $\alpha$ 1<sup>+</sup> et PLFZ<sup>+</sup> après irradiation. L'interprétation pourrait néanmoins s'avérer complexe entre les souris CTRL et KO, une diminution de la régénération des différents pools de spermatogonies indifférenciées pouvant être lié soit à une radiosensibilité différente soit au défaut de progéniteur NGN3<sup>+</sup> observé dans les souris KO, progéniteurs qui sont critiques pour la régénération tissulaire après dommage (Nakagawa, Nabeshima and Yoshida, 2007; Carrieri *et al.*, 2017). Il serait également intéressant d'étudier le rôle de DOT1L dans des cultures à court terme de spermatogonies primitives humaines, que nous avons développées, à l'aide des petites molécules inhibant l'activité méthyltransférase de DOT1L. Nous pourrions étudier si ces variations d'activité de DOT1L modifient le potentiel des cellules souches  $\beta$ -2M<sup>+</sup>SP $\alpha$ -6<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup> à former des colonies *in vitro* sur 20 jours. La fonctionnalité des CSGs pourra également être testée *in vivo* après transplantation dans des testicules de souris immunodéficientes "humanisées" NOD-*scid* IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> (NSG) pour tester le potentiel de régénération. D'autre part, un modèle de xenogreffe de tissu testiculaire humain dans les testicules de souris immunodéficientes NSG à partir de fragments frais ou congelés en collaboration avec le Dr V. Barraud-Lange (CECOS Cochin-APHP) a été développé au laboratoire. Ce modèle permettrait d'étudier *in vivo* les effets d'une inhibition chimique de DOT1L sur le pool de CSGs prépubères dans un modèle de xéno greffe de biopsie testiculaire humaine.

## Les effets pléiotropes de DOT1L sur la spermatogenèse : des cellules souches à la spermiogenèse

En plus des défauts des CSGs, la protéine DOT1L s'est avérée essentielle pour la production de spermatozoïdes fonctionnels en utilisant le même modèle d'inactivation *Stra8-Cre* conditionnel, en accord avec l'expression de DOT1L dans les cellules post-méiotiques (Blanco *et al.*, 2022). Par conséquent, DOT1L est essentielle à plusieurs étapes du processus de différenciation de la lignée germinale, des CSGs prépubères à adultes, jusqu'à l'étape ultime de la spermiogenèse. Ces effets pléiotropes de la perte de DOT1L sur le processus de spermatogenèse ne sont pas si inattendus, DOT1L étant impliqué dans de nombreux processus biologiques différents tels que le cycle cellulaire, le développement, la reprogrammation, la réparation des dommages à l'ADN ou l'activation de la transcription (Kim, Choi and Kim, 2014). Cette observation pourrait également être liée soit au rôle propre de la protéine DOT1L dans des complexes protéiques spécifiques tels que le complexe DOT ou le complexe SEC par exemple, soit à une conséquence de la perte de la marque épigénétique H3K79me<sub>2-3</sub>. Des investigations futures doivent être menées pour démêler leur rôle respectif dans les CSGs et les défauts spermatogoniaux observés.





# Conclusion



L'identité du pool de CSGs humaines et les mécanismes moléculaires gouvernant leur autorenewement restent peu connus malgré les récents progrès réalisés grâce aux approches par scRNAseq. Mon travail de thèse sur le développement d'un nouveau panel de 14 marqueurs cellulaires analysé par cytométrie spectrale permet de mieux décrire et résoudre la complexité de la population de spermatogonies primitives humaines, dont les CSGs. Ce type d'étude permet d'analyser la dynamique d'expression des marqueurs des CSGs humaines au sein d'une population complexe. Dans de futures études, la combinaison d'un plus grand nombre de biomarqueurs devrait contribuer à une meilleure hiérarchisation des états successifs de CSGs, et préciser l'hétérogénéité du pool spermatogonial humain notamment en termes de potentiel de régénération. En effet cette approche permet la purification de populations d'intérêt pour tester leur fonctionnalité après transplantation testiculaire. Il conviendra également de corrélérer cette hiérarchie avec les données obtenues dans les études de scRNAseq. Cette étape sera cruciale pour le développement de thérapie cellulaire de l'infertilité à partir des CSGs.

Notre étude précise le rôle de DOT1L dans les CSGs et le maintien du pool spermatogonial, essentiel pour la spermatogenèse et la fertilité. Il fournit de nouvelles informations sur les modificateurs épigénétiques qui régulent l'ontogenèse, l'homéostasie et la différenciation des CSGs. DOT1L est un régulateur essentiel de l'autorenewement/différenciation des CSGs, des cellules souches embryonnaires, des cellules souches du tissu somatique (cellules souches hématopoïétiques et neurales), montrant une large implication de DOT1L dans l'autorenewement/différenciation des cellules souches normales, mais il est également impliqué dans la régulation des cellules souches leucémiques (McLean, Karemaker and van Leeuwen, 2014; Sarno, Nebbioso and Altucci, 2019). DOT1L est en effet une cible intéressante pour le traitement du cancer, compte tenu du rôle de DOT1L dans la leucémie de lignée mixte (MLL). Nos données et d'autres (Lin *et al.*, 2022) soulignent les effets négatifs de la perte de DOT1L sur l'établissement du pool de CSGs, en particulier pendant la période néonatale/prépubère. La fréquence élevée des réarrangements du gène de la leucémie mixte (MLL) dans les leucémies infantiles met en évidence la nécessité d'étudier attentivement les effets de l'inhibition de DOT1L sur la fertilité et les conditions des protocoles thérapeutiques qui pourraient être modulées (traitement aigu, chronique à long terme des inhibiteurs de DOT1L, gamme de dose conduisant à une

inhibition complète/partielle de DOT1L par exemple). Compte tenu de l'émergence des modulateurs épigénétiques dans la régulation des cellules cancéreuses, ces découvertes pourraient aider à concevoir de futurs protocoles thérapeutiques contre le cancer permettant de prévenir les effets secondaires de la thérapie anticancéreuse afin de préserver la fertilité masculine humaine.





## Références

- Aloisio, G.M. *et al.* (2014) 'PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis', *The Journal of Clinical Investigation*, 124(9), pp. 3929–3944. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI75943>.
- Altaf, M. *et al.* (2007) 'Interplay of chromatin modifiers on a short basic patch of histone H4 tail defines the boundary of telomeric heterochromatin', *Molecular Cell*, 28(6), pp. 1002–1014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.002>.
- Anderson, C.J. *et al.* (2019) 'Structural Basis for Recognition of Ubiquitylated Nucleosome by Dot1L Methyltransferase', *Cell Reports*, 26(7), pp. 1681-1690.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.058>.
- Arents, G. and Moudrianakis, E.N. (1993) 'Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), pp. 10489–10493. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10489>.
- Azizi, H. *et al.* (2016) 'Derivation of Pluripotent Cells from Mouse SSCs Seems to Be Age Dependent', *Stem Cells International*, 2016, p. 8216312. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/8216312>.
- Azuara, V. *et al.* (2006) 'Chromatin signatures of pluripotent cell lines', *Nature Cell Biology*, 8(5), pp. 532–538. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1403>.
- Balgobind, B.V. *et al.* (2011) 'The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia', *Leukemia*, 25(8), pp. 1239–1248. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2011.90>.
- Ballow, D. *et al.* (2006) 'Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation', *Developmental Biology*, 294(1), pp. 161–167. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.027>.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011) 'Regulation of chromatin by histone modifications', *Cell Research*, 21(3), pp. 381–395. Available at: <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- Bao, J. *et al.* (2013) 'Incomplete cre-mediated excision leads to phenotypic differences between Stra8-iCre; Mov10l1(lox/lox) and Stra8-iCre; Mov10l1(lox/Δ) mice', *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 51(7), pp. 481–490. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvg.22389>.

- Barnum, K.J. and O'Connell, M.J. (2014) 'Cell Cycle Regulation by Checkpoints', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1170, pp. 29–40. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2).
- Barroca, V. *et al.* (2009a) 'Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*', *Nature Cell Biology*, 11(2), pp. 190–196. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1826>.
- Barroca, V. *et al.* (2009b) 'Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*', *Nature Cell Biology*, 11(2), pp. 190–196. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1826>.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2007) 'DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation', *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), pp. 238–245. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.009>.
- Bartel, D.P. (2004) 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116(2), pp. 281–297. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5).
- Bernstein, B.E. *et al.* (2006) 'A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells', *Cell*, 125(2), pp. 315–326. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>.
- Bernt, K.M. *et al.* (2011) 'MLL-Rearranged Leukemia Is Dependent on Aberrant H3K79 Methylation by DOT1L', *Cancer Cell*, 20(1), pp. 66–78. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.010>.
- Bird, A. (2002) 'DNA methylation patterns and epigenetic memory', *Genes & Development*, 16(1), pp. 6–21. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.947102>.
- Blanc, R.S. and Richard, S. (2017) 'Arginine Methylation: The Coming of Age', *Molecular Cell*, 65(1), pp. 8–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003>.
- Blanco, M. *et al.* (2022) 'The histone methyltransferase DOT1L regulates chromatin reorganization and gene expression during the postmeiotic differentiation of male germ cells'. *bioRxiv*, p. 2022.10.17.512530. Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.10.17.512530>.
- Botuyan, M.V. *et al.* (2006) 'Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair', *Cell*, 127(7), pp. 1361–1373. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.043>.

Bowles, J. *et al.* (2009) 'Male-specific expression of Aldh1a1 in mouse and chicken fetal testes: Implications for retinoid balance in gonad development', *Developmental Dynamics*, 238(8), pp. 2073–2080. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvdy.22024>.

Boyer, L.A. *et al.* (2006) 'Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells', *Nature*, 441(7091), pp. 349–353. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04733>.

Brinster, R.L. and Avarbock, M.R. (1994) 'Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), pp. 11303–11307.

Brinster, R.L. and Zimmermann, J.W. (1994) 'Spermatogenesis following male germ-cell transplantation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), pp. 11298–11302.

Buaas, F.W. *et al.* (2004) 'Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal', *Nature Genetics*, 36(6), pp. 647–652. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng1366>.

Cao, K. *et al.* (2020) 'DOT1L-controlled cell-fate determination and transcription elongation are independent of H3K79 methylation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(44), pp. 27365–27373. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2001075117>.

Cao, R. *et al.* (2002) 'Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing', *Science (New York, N.Y.)*, 298(5595), pp. 1039–1043. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1076997>.

Caron, P. *et al.* (2015) 'Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks', *Cell Reports*, 13(8), pp. 1598–1609. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.024>.

Carrieri, C. *et al.* (2017) 'A transit-amplifying population underpins the efficient regenerative capacity of the testis', *The Journal of Experimental Medicine*, 214(6), pp. 1631–1641. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20161371>.

Castrillon, D.H. *et al.* (2000) 'The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), pp. 9585–9590. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.160274797>.

Cavalli, G. and Paro, R. (1998) 'The Drosophila Fab-7 Chromosomal Element Conveys Epigenetic Inheritance during Mitosis and Meiosis', *Cell*, 93(4), pp. 505–518. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81181-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81181-2).

Chagraoui, H. *et al.* (2018) 'SCL/TAL1 cooperates with Polycomb RYBP-PRC1 to suppress alternative lineages in blood-fated cells', *Nature Communications*, 9(1), p. 5375. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07787-6>.

Chakraborty, P. *et al.* (2014) 'LIN28A marks the spermatogonial progenitor population and regulates its cyclic expansion', *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(4), pp. 860–873. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.1584>.

Chan, F. *et al.* (2014) 'Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes', *Genes & Development*, 28(12), pp. 1351–1362. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.240465.114>.

Chen, C. *et al.* (2005) 'ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche', *Nature*, 436(7053), pp. 1030–1034. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03894>.

Chen, C.W. *et al.* (2015) 'DOT1L inhibits SIRT1-mediated epigenetic silencing to maintain leukemic gene expression in MLL-rearranged leukemia', *Nature medicine*, 21(4), pp. 335–343. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3832>.

Chen, H. *et al.* (2021) 'Dissecting mammalian spermatogenesis using spatial transcriptomics', *Cell Reports*, 37(5), p. 109915. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109915>.

Chen, P. *et al.* (2019) 'Characterization and differentiation of CD51+ Stem Leydig cells in adult mouse testes', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 493, p. 110449. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110449>.

Cheng, K. *et al.* (2020) 'Unique Epigenetic Programming Distinguishes Regenerative Spermatogonial Stem Cells in the Developing Mouse Testis', *iScience*, 23(10), p. 101596. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101596>.

Cheng, X., Collins, R.E. and Zhang, X. (2005) 'Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes', *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34, pp. 267–294. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144452>.

Chiarini-Garcia, H. *et al.* (2001) 'Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random', *Biology of Reproduction*, 65(4), pp. 1179–1185.

Chikhovskaya, J.V. *et al.* (2014) 'Mesenchymal origin of multipotent human testis-derived stem cells in human testicular cell cultures', *Molecular Human Reproduction*, 20(2), pp. 155–167. Available at: <https://doi.org/10.1093/molehr/gat076>.

Clermont, Y. (1966a) 'Renewal of spermatogonia in man', *The American Journal of Anatomy*, 118(2), pp. 509–524. Available at: <https://doi.org/10.1002/aja.1001180211>.

Clermont, Y. (1966b) 'Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population', *Fertility and Sterility*, 17(6), pp. 705–721.

Clermont, Y. and Bustos-Obregon, E. (1968) 'Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto"', *American Journal of Anatomy*, 122(2), pp. 237–247. Available at: <https://doi.org/10.1002/aja.1001220205>.

Clermont, Y. and Leblond, C.P. (1959) 'Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*', *The American Journal of Anatomy*, 104, pp. 237–273. Available at: <https://doi.org/10.1002/aja.1001040204>.

Clouaire, T. *et al.* (2018) 'Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures', *Molecular Cell*, 72(2), pp. 250–262.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.020>.

Conrad, S. *et al.* (2008) 'Generation of pluripotent stem cells from adult human testis', *Nature*, 456(7220), pp. 344–349. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07404>.

Corbineau, S. *et al.* (2016) 'Spermatogonial stem cells and progenitors are refractory to reprogramming to pluripotency by the transcription factors Oct3/4, c-Myc, Sox2 and Klf4', *Oncotarget*, 8(6), pp. 10050–10063. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14327>.

Cui, K. *et al.* (2009) 'Chromatin Signatures in Multipotent Human Hematopoietic Stem Cells Indicate the Fate of Bivalent Genes during Differentiation', *Cell Stem Cell*, 4(1), pp. 80–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.011>.

Daigle, S.R. *et al.* (2011) 'Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor', *Cancer Cell*, 20(1), pp. 53–65. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.009>.

DeFalco, T. *et al.* (2015) 'Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis', *Cell reports*, 12(7), pp. 1107–1119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.015>.

- Demarco, R.S. *et al.* (2014) 'Investigating Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*', *Methods (San Diego, Calif.)*, 68(1), pp. 218–227. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.020>.
- Di Persio, S. *et al.* (2017) 'Spermatogonial kinetics in humans', *Development (Cambridge, England)*, 144(19), pp. 3430–3439. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.150284>.
- Di Persio, S. *et al.* (2021) 'Single-cell RNA-seq unravels alterations of the human spermatogonial stem cell compartment in patients with impaired spermatogenesis', *Cell Reports Medicine*, 2(9), p. 100395. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100395>.
- Dianov, G.L. and Hübscher, U. (2013) 'Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel', *Nucleic Acids Research*, 41(6), pp. 3483–3490. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt076>.
- Dijk, M. *et al.* (2014) 'Insight in the multilevel regulation of NER', *Experimental Cell Research*, 329(1), pp. 116–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.010>.
- Dlakic, M. (2001) 'Chromatin silencing protein and pachytene checkpoint regulator Dot1p has a methyltransferase fold', *Trends in Biochemical Sciences*, 26(7), pp. 405–407. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01856-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01856-4).
- Do, V.H. and Canzar, S. (2021) 'A generalization of t-SNE and UMAP to single-cell multimodal omics', *Genome Biology*, 22(1), p. 130. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02356-5>.
- Dovere, L. *et al.* (2013) 'The Niche-Derived Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Induces Migration of Mouse Spermatogonial Stem/Progenitor Cells', *PLoS ONE*, 8(4), p. e59431. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059431>.
- Dovey, S.L. *et al.* (2013) 'Eliminating malignant contamination from therapeutic human spermatogonial stem cells', *The Journal of Clinical Investigation*, 123(4), pp. 1833–1843. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI65822>.
- Duester, G. (2000) 'Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid', *European journal of biochemistry*, 267(14). Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01497.x>.
- Dulev, S. *et al.* (2014) 'SET8 methyltransferase activity during the DNA double-strand break response is required for recruitment of 53BP1', *EMBO reports*, 15(11), pp. 1163–1174. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201439434>.

Dura, M. *et al.* (2022) 'DNMT3A-dependent DNA methylation is required for spermatogonial stem cells to commit to spermatogenesis', *Nature Genetics*, 54(4), pp. 469–480. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01040-z>.

Ehrlich, M. *et al.* (1982) 'Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.', *Nucleic Acids Research*, 10(8), pp. 2709–2721.

Endo, T. *et al.* (2015) 'Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), pp. E2347-2356. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1505683112>.

Endo, T. *et al.* (2017) 'Periodic production of retinoic acid by meiotic and somatic cells coordinates four transitions in mouse spermatogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(47), pp. E10132–E10141. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1710837114>.

Erb, M.A. *et al.* (2017) 'Transcription control by the ENL YEATS domain in acute leukaemia', *Nature*, 543(7644), pp. 270–274. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature21688>.

Etchegaray, J.-P. and Mostoslavsky, R. (2015) 'Cell Fate by SIRT6 and TETs', *Cell Cycle*, 14(14), pp. 2187–2188. Available at: <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1060768>.

Extavour, C.G. and Akam, M. (2003) 'Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation', *Development (Cambridge, England)*, 130(24), pp. 5869–5884. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.00804>.

Ezhkova, E. *et al.* (2009) 'Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells', *Cell*, 136(6), pp. 1122–1135. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.043>.

Fawcett, D.W., Neaves, W.B. and Flores, M.N. (1973) 'Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis', *Biology of Reproduction*, 9(5), pp. 500–532. Available at: <https://doi.org/10.1093/biolreprod/9.5.500>.

Fayomi, A.P. *et al.* (2019) 'Autologous Grafting of Cryopreserved Prepubertal Rhesus Testis Produces Sperm and Offspring', *Science (New York, N.Y.)*, 363(6433), pp. 1314–1319. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aav2914>.

Fayomi, A.P. and Orwig, K.E. (2018) 'Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men', *Stem Cell Research*, 29, pp. 207–214. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.009>.

Feng, Q. *et al.* (2002) 'Methylation of H3-Lysine 79 Is Mediated by a New Family of HMTases without a SET Domain', *Current Biology*, 12(12), pp. 1052–1058. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00901-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00901-6).

Feng, Y. *et al.* (2010) 'Early mammalian erythropoiesis requires the Dot1L methyltransferase', *Blood*, 116(22), pp. 4483–4491. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276501>.

Ferrari, F. *et al.* (2020) 'DOT1L-mediated murine neuronal differentiation associates with H3K79me2 accumulation and preserves SOX2-enhancer accessibility', *Nature Communications*, 11(1), p. 5200. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19001-7>.

Ferrer-Font, L. *et al.* (2020) 'High-dimensional data analysis algorithms yield comparable results for mass cytometry and spectral flow cytometry data', *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 97(8), pp. 824–831. Available at: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24016>.

Fingerman, I.M., Li, H.-C. and Briggs, S.D. (2007) 'A charge-based interaction between histone H4 and Dot1 is required for H3K79 methylation and telomere silencing: identification of a new trans-histone pathway', *Genes & Development*, 21(16), pp. 2018–2029. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1560607>.

Gao, X. *et al.* (2008) 'ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), pp. 6656–6661. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0801802105>.

Garbuzov, A. *et al.* (2018) 'Purification of GFR $\alpha$ 1+ and GFR $\alpha$ 1- Spermatogonial Stem Cells Reveals a Niche-Dependent Mechanism for Fate Determination', *Stem Cell Reports*, 10(2), pp. 553–567. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.009>.

Givelet, M. *et al.* (2022) 'Transcriptional profiling of  $\beta$ -2M-SP $\alpha$ -6+THY1+ spermatogonial stem cells in human spermatogenesis', *Stem Cell Reports*, 17(4), pp. 936–952. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.02.017>.

Godmann, M. *et al.* (2007) 'Dynamic Regulation of Histone H3 Methylation at Lysine 4 in Mammalian Spermatogenesis1', *Biology of Reproduction*, 77(5), pp. 754–764. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062265>.

- Golestaneh, N. *et al.* (2009) 'Pluripotent Stem Cells Derived From Adult Human Testes', *Stem Cells and Development*, 18(8), pp. 1115–1125. Available at: <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0347>.
- Greer, E.L. and Shi, Y. (2012) 'Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance', *Nature Reviews Genetics*, 13(5), pp. 343–357. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3173>.
- Grenon, M. *et al.* (2007) 'Docking onto chromatin via the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Tudor domain', *Yeast*, 24(2), pp. 105–119. Available at: <https://doi.org/10.1002/yea.1441>.
- Grewal, S.I. and Klar, A.J. (1996) 'Chromosomal inheritance of epigenetic states in fission yeast during mitosis and meiosis', *Cell*, 86(1), pp. 95–101. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80080-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80080-x).
- Grimson, A. *et al.* (2007) 'MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing', *Molecular Cell*, 27(1), pp. 91–105. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>.
- Grisanti, L. *et al.* (2009) 'Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(12), pp. 3043–3052. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.206>.
- Guan, K. *et al.* (2006) 'Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis', *Nature*, 440(7088), pp. 1199–1203. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04697>.
- Guo, J. *et al.* (2017) 'Chromatin and Single-Cell RNA-Seq Profiling Reveal Dynamic Signaling and Metabolic Transitions during Human Spermatogonial Stem Cell Development', *Cell Stem Cell*, 21(4), pp. 533–546.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.003>.
- Guo, J. *et al.* (2018) 'The adult human testis transcriptional cell atlas', *Cell Research*, 28(12), pp. 1141–1157. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0099-2>.
- Guo, J. *et al.* (2020) 'The Dynamic Transcriptional Cell Atlas of Testis Development during Human Puberty', *Cell Stem Cell*, 26(2), pp. 262–276.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.005>.
- Guo, J. *et al.* (2021) 'Single-cell Analysis of the Developing Human Testis Reveals Somatic Niche Cell Specification and Fetal Germline Stem Cell Establishment', *Cell stem cell*, 28(4), pp. 764–778.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.12.004>.

Hara, K. *et al.* (2014) 'Mouse Spermatogenic Stem Cells Continually Interconvert between Equipotent Singly Isolated and Syncytial States', *Cell Stem Cell*, 14(5), pp. 658–672. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.019>.

Harikumar, A. and Meshorer, E. (2015) 'Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells', *EMBO reports*, 16(12), pp. 1609–1619. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201541011>.

Heerema, N.A. *et al.* (1999) 'Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group', *Leukemia*, 13(5), pp. 679–686. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401413>.

Heitz, E. (1928) 'Das heterochromatin der moose.', *Bornträger* [Preprint].

Helsel, A.R. *et al.* (2017) 'ID4 levels dictate the stem cell state in mouse spermatogonia', *Development (Cambridge, England)*, 144(4), pp. 624–634. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.146928>.

Hermann, B.P. *et al.* (2009) 'Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 24(7), pp. 1704–1716. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dep073>.

Hermann, B.P. *et al.* (2010) 'Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents?', *Reproduction (Cambridge, England)*, 139(3), pp. 479–493. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-09-0255>.

Hermann, B.P. *et al.* (2012) 'Spermatogonial stem cell transplantation into Rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm', *Cell stem cell*, 11(5), pp. 715–726. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.017>.

Hermann, B.P. *et al.* (2018) 'The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids', *Cell reports*, 25(6), pp. 1650–1667.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.026>.

Hilscher, B. *et al.* (1974) 'Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis', *Cell and Tissue Research*, 154(4), pp. 443–470. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00219667>.

- Hubbard, E.J.A. and Schedl, T. (2019) 'Biology of the *Caenorhabditis elegans* Germline Stem Cell System', *Genetics*, 213(4), pp. 1145–1188. Available at: <https://doi.org/10.1534/genetics.119.300238>.
- Huckins, C. (1971a) 'The Spermatogonial Stem Cell Population in Adult Rats', *Cell Proliferation*, 4(4), pp. 335–349. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1971.tb01544.x>.
- Huckins, C. (1971b) 'The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation', *The Anatomical Record*, 169(3), pp. 533–557. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.1091690306>.
- Hume, D.A. *et al.* (1984) 'The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(13), pp. 4174–4177. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.81.13.4174>.
- Huyen, Y. *et al.* (2004) 'Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks', *Nature*, 432(7015), pp. 406–411. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03114>.
- Hyun, K. *et al.* (2017) 'Writing, erasing and reading histone lysine methylations', *Experimental & Molecular Medicine*, 49(4), p. e324. Available at: <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>.
- Ishii, K. *et al.* (2012) 'FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of *Etv5* and *Bcl6b* through MAP2K1 activation', *Development*, 139(10), pp. 1734–1743. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.076539>.
- Izadyar, F. *et al.* (2011) 'Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis', *Human Reproduction*, 26(6), pp. 1296–1306. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/der026>.
- Jacquet, K. *et al.* (2016) 'The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation', *Molecular Cell*, 62(3), pp. 409–421. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.031>.
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003) 'Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals', *Nature Genetics*, 33(3), pp. 245–254. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng1089>.
- Jahnukainen, K. *et al.* (2012) 'Autologous ectopic grafting of cryopreserved testicular tissue preserves the fertility of prepubescent monkeys which receive a sterilizing cytotoxic therapy',

*Cancer research*, 72(20), pp. 5174–5178. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1317>.

Jain, S. *et al.* (2004) 'Mice expressing a dominant-negative Ret mutation phenocopy human Hirschsprung disease and delineate a direct role of Ret in spermatogenesis', *Development (Cambridge, England)*, 131(21), pp. 5503–5513. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.01421>.

Jaiswal, S. *et al.* (2009) 'CD47 is up-regulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis', *Cell*, 138(2), pp. 271–285. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046>.

Jan, S.Z. *et al.* (2017) 'Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis', *Development (Cambridge, England)*, 144(20), pp. 3659–3673. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.152413>.

Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (2001) 'Asymmetric cell division in the Drosophila nervous system', *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(11), pp. 772–779. Available at: <https://doi.org/10.1038/35097516>.

Janzen, C.J. *et al.* (2006) 'Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two DOT1 homologs is important for cell cycle regulation in Trypanosoma brucei', *Molecular Cell*, 23(4), pp. 497–507. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.027>.

Jarjour, N.N. *et al.* (2019) 'Bhlhe40 mediates tissue-specific control of macrophage proliferation in homeostasis and type 2 immunity', *Nature Immunology*, 20(6), pp. 687–700. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0382-5>.

Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) 'Translating the Histone Code', *Science*, 293(5532), pp. 1074–1080. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1063127>.

Jin, C. *et al.* (2017) 'EZH2 deletion promotes spermatogonial differentiation and apoptosis', *Reproduction*, 154(5), pp. 615–625. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-17-0302>.

Jo, S.Y. *et al.* (2011) 'Requirement for Dot1l in murine postnatal hematopoiesis and leukemogenesis by MLL translocation', *Blood*, 117(18), pp. 4759–4768. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327668>.

Johnson, L., Chaturvedi, P.K. and Williams, J.D. (1992) 'Missing Generations of Spermatocytes and Spermatids in Seminiferous Epithelium Contribute to Low Efficiency of Spermatogenesis

in Humans<sup>1</sup>, *Biology of Reproduction*, 47(6), pp. 1091–1098. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.6.1091>.

Jones, B. *et al.* (2008) 'The histone H3K79 methyltransferase Dot1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure', *PLoS genetics*, 4(9), p. e1000190. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000190>.

Juan, A.H. *et al.* (2011) 'Polycomb EZH2 controls self-renewal and safeguards the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells', *Genes & Development*, 25(8), pp. 789–794. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.2027911>.

Jürgens, G. (1985) 'A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*', *Nature*, 316(6024), pp. 153–155. Available at: <https://doi.org/10.1038/316153a0>.

Kanatsu-Shinohara, M. *et al.* (2003) 'Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells', *Biology of Reproduction*, 69(2), pp. 612–616. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017012>.

Kanatsu-Shinohara, M. *et al.* (2004) 'Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis', *Cell*, 119(7), pp. 1001–1012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.011>.

Kanatsu-Shinohara, M. *et al.* (2007) 'Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture', *Biology of Reproduction*, 76(1), pp. 55–62. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.055863>.

Kanatsu-Shinohara, M. *et al.* (2012) 'Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture', *Cell Stem Cell*, 11(4), pp. 567–578. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.011>.

Kang, J.-Y. *et al.* (2018) 'KDM2B is a histone H3K79 demethylase and induces transcriptional repression via sirtuin-1-mediated chromatin silencing', *The FASEB Journal*, 32(10), pp. 5737–5750. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.201800242R>.

Kass, E.M. *et al.* (2013) 'Double-strand break repair by homologous recombination in primary mouse somatic cells requires BRCA1 but not the ATM kinase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14), pp. 5564–5569. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1216824110>.

Kato, Y. *et al.* (2015) 'FANCB is essential in the male germline and regulates H3K9 methylation on the sex chromosomes during meiosis', *Human Molecular Genetics*, 24(18), pp. 5234–5249. Available at: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv244>.

Kim, W., Choi, M. and Kim, J.-E. (2014) 'The histone methyltransferase Dot1/DOT1L as a critical regulator of the cell cycle', *Cell Cycle*, 13(5), pp. 726–738. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.28104>.

Kitadate, Y. *et al.* (2019) 'Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche', *Cell Stem Cell*, 24(1), pp. 79-92.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.013>.

Kluin, P.M. and de Rooij, D.G. (1981) 'A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse', *International Journal of Andrology*, 4(4), pp. 475–493. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1981.tb00732.x>.

Ko, K. *et al.* (2009) 'Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells', *Cell Stem Cell*, 5(1), pp. 87–96. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.025>.

Ko, K. *et al.* (2011) 'Brief Report: Evaluating the Potential of Putative Pluripotent Cells Derived from Human Testis', *Stem Cells*, 29(8), pp. 1304–1309. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.671>.

Komai, Y. *et al.* (2014) 'Bmi1 expression in long-term germ stem cells', *Scientific Reports*, 4(1), p. 6175. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep06175>.

von Kopylow, K. *et al.* (2010) 'Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(5), pp. 1104–1112. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/deq053>.

von Kopylow, K. and Spiess, A.-N. (2017) 'Human spermatogonial markers', *Stem Cell Research*, 25, pp. 300–309. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.11.011>.

Kossack, N. *et al.* (2009) 'Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(1), pp. 138–149. Available at: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0439>.

Kouzarides, T. (2007) 'Chromatin modifications and their function', *Cell*, 128(4), pp. 693–705. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.

- Krivtsov, A.V. and Armstrong, S.A. (2007) 'MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development', *Nature Reviews Cancer*, 7(11), pp. 823–833. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2253>.
- Kubota, H., Avarbock, M.R. and Brinster, R.L. (2003) 'Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), pp. 6487–6492. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0631767100>.
- Kubota, H., Avarbock, M.R. and Brinster, R.L. (2004) 'Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells', *Biology of Reproduction*, 71(3), pp. 722–731. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.029207>.
- Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1998) 'Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation', *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 20(8), pp. 615–626. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199808\)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H).
- La, H.M., Chan, A.-L., *et al.* (2018) 'GILZ-dependent modulation of mTORC1 regulates spermatogonial maintenance', *Development*, 145(18), p. dev165324. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.165324>.
- La, H.M., Mäkelä, J.-A., *et al.* (2018) 'Identification of dynamic undifferentiated cell states within the male germline', *Nature Communications*, 9(1), p. 2819. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04827-z>.
- Lacoste, N. *et al.* (2002) 'Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34), pp. 30421–30424. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C200366200>.
- Laronda, M.M. and Jameson, J.L. (2011) 'Sox3 functions in a cell-autonomous manner to regulate spermatogonial differentiation in mice', *Endocrinology*, 152(4), pp. 1606–1615. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2010-1249>.
- Lassalle, B. *et al.* (2004a) "'Side Population" cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells', *Development (Cambridge, England)*, 131(2), pp. 479–487. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.00918>.

Lassalle, B. *et al.* (2004b) “Side Population” cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells’, *Development (Cambridge, England)*, 131(2), pp. 479–487. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.00918>.

Law, N.C. and Oatley, J.M. (2020) ‘Developmental underpinnings of spermatogonial stem cell establishment’, *Andrology*, 8(4), pp. 852–861. Available at: <https://doi.org/10.1111/andr.12810>.

Leblond, C.P. and Clermont, Y. (1952) ‘Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), pp. 548–573. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x>.

Leeson, T.S. and Cookson, F.B. (1974) ‘The mammalian testicular capsule and its muscle elements’, *Journal of Morphology*, 144(2), pp. 237–253. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmor.1051440208>.

Li, F. *et al.* (2021) ‘Shift in G1-Checkpoint from ATM-Alone to a Cooperative ATM Plus ATR Regulation with Increasing Dose of Radiation’, *Cells*, 11(1), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11010063>.

Li, Y. *et al.* (2014) ‘AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation’, *Cell*, 159(3), pp. 558–571. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.049>.

Liao, J. *et al.* (2019) ‘Revealing cellular and molecular transitions in neonatal germ cell differentiation using single cell RNA sequencing’, *Development*, 146(6), p. dev174953. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.174953>.

Liao, J. *et al.* (2021) ‘Transcriptomic and epigenomic profiling of young and aged spermatogonial stem cells reveals molecular targets regulating differentiation’, *PLoS Genetics*, 17(7), p. e1009369. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009369>.

Liao, J. and Szabó, P.E. (2020) ‘Maternal DOT1L is dispensable for mouse development’, *Scientific Reports*, 10(1), p. 20636. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77545-6>.

Lin, H. *et al.* (2022) ‘Histone methyltransferase DOT1L is essential for self-renewal of germline stem cells’, *Genes & Development*, 36(11–12), pp. 752–763. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.349550.122>.

List, O. *et al.* (2009) 'Overexpression of grappa encoding a histone methyltransferase enhances stress resistance in *Drosophila*', *Hereditas*, 146(1), pp. 19–28. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2008.02080.x>.

Lok, D. and de Rooij, D.G. (1983) 'Spermatogonial multiplication in the Chinese hamster. III. Labelling indices of undifferentiated spermatogonia throughout the cycle of the seminiferous epithelium', *Cell and Tissue Kinetics*, 16(1), pp. 31–40.

Luger, K. *et al.* (1997) 'Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution', *Nature*, 389(6648), pp. 251–260. Available at: <https://doi.org/10.1038/38444>.

Ma, Y. *et al.* (2004) 'A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining', *Molecular Cell*, 16(5), pp. 701–713. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.017>.

Maezawa, S. *et al.* (2017) 'Polycomb directs timely activation of germline genes in spermatogenesis', *Genes & Development*, 31(16), pp. 1693–1703. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.302000.117>.

Maezawa, S. *et al.* (2018) 'Polycomb protein SCML2 facilitates H3K27me3 to establish bivalent domains in the male germline', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19), pp. 4957–4962. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1804512115>.

Mailand, N. *et al.* (2000) 'Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage', *Science (New York, N.Y.)*, 288(5470), pp. 1425–1429. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1425>.

Masaki, K. *et al.* (2018) 'FGF2 Has Distinct Molecular Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche', *Stem Cell Reports*, 10(6), pp. 1782–1792. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.016>.

McCarrey, J.R. (2013) 'Toward a more precise and informative nomenclature describing fetal and neonatal male germ cells in rodents', *Biology of Reproduction*, 89(2), p. 47. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110502>.

McLean, C.M., Karemaker, I.D. and van Leeuwen, F. (2014) 'The emerging roles of DOT1L in leukemia and normal development', *Leukemia*, 28(11), pp. 2131–2138. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2014.169>.

Meng, F. *et al.* (2020) 'Synergy between SIRT1 and SIRT6 helps recognize DNA breaks and potentiates the DNA damage response and repair in humans and mice', *eLife*, 9, p. e55828. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.55828>.

Meng, X. *et al.* (2000) 'Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF', *Science (New York, N.Y.)*, 287(5457), pp. 1489–1493. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1489>.

Meyer, C. *et al.* (2006) 'The MLL recombinome of acute leukemias', *Leukemia*, 20(5), pp. 777–784. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404150>.

'Molecular control of rodent spermatogenesis' (2012) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), pp. 1838–1850. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.008>.

Molfetta, R. *et al.* (2020) 'CD155: A Multi-Functional Molecule in Tumor Progression', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), p. 922. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21030922>.

Morales, V. *et al.* (2001) 'Chromatin structure and dynamics: functional implications', *Biochimie*, 83(11–12), pp. 1029–1039. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01347-5](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01347-5).

Mori, H. and Christensen, A.K. (1980) 'Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis', *The Journal of Cell Biology*, 84(2), pp. 340–354. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.84.2.340>.

Mori, J. *et al.* (2018) 'Maintenance of murine platelet homeostasis by the kinase Csk and phosphatase CD148', *Blood*, 131(10), pp. 1122–1144. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-768077>.

Morrison, S.J. and Spradling, A.C. (2008) 'Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life', *Cell*, 132(4), pp. 598–611. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>.

Mu, W. *et al.* (2014) 'Repression of the soma-specific transcriptome by Polycomb-repressive complex 2 promotes male germ cell development', *Genes & Development*, 28(18), pp. 2056–2069. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.246124.114>.

- Nagano, M., McCarrey, J.R. and Brinster, R.L. (2001) 'Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes', *Biology of Reproduction*, 64(5), pp. 1409–1416. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1409>.
- Nagano, M., Patrizio, P. and Brinster, R.L. (2002) 'Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes', *Fertility and Sterility*, 78(6), pp. 1225–1233. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)04345-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)04345-5).
- Nagano, M.C. (2003) 'Homing Efficiency and Proliferation Kinetics of Male Germ Line Stem Cells Following Transplantation in Mice1', *Biology of Reproduction*, 69(2), pp. 701–707. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016352>.
- Nakagawa, T. *et al.* (2010) 'Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment', *Science (New York, N.Y.)*, 328(5974), pp. 62–67. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1182868>.
- Nakagawa, T. *et al.* (2021) 'A multistate stem cell dynamics maintains homeostasis in mouse spermatogenesis', *Cell Reports*, 37(3), p. 109875. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109875>.
- Nakagawa, T., Nabeshima, Y. and Yoshida, S. (2007) 'Functional Identification of the Actual and Potential Stem Cell Compartments in Mouse Spermatogenesis', *Developmental Cell*, 12(2), pp. 195–206. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.002>.
- Nakaki, F. and Saitou, M. (2014) 'PRDM14: a unique regulator for pluripotency and epigenetic reprogramming', *Trends in Biochemical Sciences*, 39(6), pp. 289–298. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.04.003>.
- Nakata, H. *et al.* (2015) 'Three-dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse', *Journal of Anatomy*, 227(5), pp. 686–694. Available at: <https://doi.org/10.1111/joa.12375>.
- Naughton, C.K. *et al.* (2006) 'Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate', *Biology of Reproduction*, 74(2), pp. 314–321. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.047365>.
- Neaves, W.B. (1975) 'Leydig cells', *Contraception*, 11(5), pp. 571–606. Available at: [https://doi.org/10.1016/0010-7824\(75\)90111-0](https://doi.org/10.1016/0010-7824(75)90111-0).

- Ng, H.H. *et al.* (2002) 'Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(38), pp. 34655–34657. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C200433200>.
- Nguyen, Anh Tram *et al.* (2011) 'DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis', *Blood*, 117(25), pp. 6912–6922. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-334359>.
- Nguyen, Anh T *et al.* (2011) 'Essential role of DOT1L in maintaining normal adult hematopoiesis', *Cell Research*, 21(9), pp. 1370–1373. Available at: <https://doi.org/10.1038/cr.2011.115>.
- Nguyen, A.T. and Zhang, Y. (2011) 'The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation', *Genes & Development*, 25(13), pp. 1345–1358. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.2057811>.
- Nickkholgh, B. *et al.* (2014) 'Enrichment of spermatogonial stem cells from long-term cultured human testicular cells', *Fertility and Sterility*, 102(2), pp. 558-565.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.022>.
- Noll, M. and Kornberg, R.D. (1977) 'Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1', *Journal of Molecular Biology*, 109(3), pp. 393–404. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(77\)80019-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(77)80019-3).
- Oakberg, E.F. (1971a) 'A new concept of spermatogonial stem-cell renewal in the mouse and its relationship to genetic effects', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 11(1), pp. 1–7. Available at: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(71\)90027-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(71)90027-3).
- Oakberg, E.F. (1971b) 'Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse', *The Anatomical Record*, 169(3), pp. 515–531. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.1091690305>.
- Oatley, J.M. *et al.* (2009) 'Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal', *Development (Cambridge, England)*, 136(7), pp. 1191–1199. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.032243>.
- Oatley, J.M., Avarbock, M.R. and Brinster, R.L. (2007) 'Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35), pp. 25842–25851. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M703474200>.

- Oatley, J.M. and Brinster, R.L. (2012) 'The germinal stem cell niche unit in mammalian testes', *Physiological reviews*, 92(2), pp. 577–595. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011>.
- Ogawa, T. *et al.* (2000) 'Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice', *Nature Medicine*, 6(1), pp. 29–34. Available at: <https://doi.org/10.1038/71496>.
- Ohinata, Y. *et al.* (2005) 'Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice', *Nature*, 436(7048), pp. 207–213. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03813>.
- Okuda, H. *et al.* (2017) 'Cooperative gene activation by AF4 and DOT1L drives MLL-rearranged leukemia', *The Journal of Clinical Investigation*, 127(5), pp. 1918–1931. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI91406>.
- Onder, T.T. *et al.* (2012) 'Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming', *Nature*, 483(7391), pp. 598–602. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature10953>.
- Ooga, M. *et al.* (2008) 'Changes in H3K79 methylation during preimplantation development in mice', *Biology of Reproduction*, 78(3), pp. 413–424. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063453>.
- Papp, B. and Müller, J. (2006) 'Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins', *Genes & Development*, 20(15), pp. 2041–2054. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.388706>.
- Parekh, P.A., Garcia, T.X. and Hofmann, M.-C. (2019) 'Regulation of GDNF expression in Sertoli cells', *Reproduction (Cambridge, England)*, 157(3), pp. R95–R107. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-18-0239>.
- Park, I. *et al.* (2003) 'Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells', *Nature*, 423(6937), pp. 302–305. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature01587>.
- van Pelt, A.M. and de Rooij, D.G. (1990) 'Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice', *Biology of Reproduction*, 43(3), pp. 363–367. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.3.363>.
- Pui, H.P. and Saga, Y. (2017) 'Gonocytes-to-spermatogonia transition initiates prior to birth in murine testes and it requires FGF signaling', *Mechanisms of Development*, 144(Pt B), pp. 125–139. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.03.002>.

Pursani, V. *et al.* (2018) 'Transcriptional activator DOT1L putatively regulates human embryonic stem cell differentiation into the cardiac lineage', *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), p. 97. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0810-8>.

Rappold, I. *et al.* (2001) 'Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways', *The Journal of Cell Biology*, 153(3), pp. 613–620. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.613>.

Robertson, K.D. (2005) 'DNA methylation and human disease', *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), pp. 597–610. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg1655>.

Rodrigues, S.G. *et al.* (2019) 'Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution', *Science (New York, N.Y.)*, 363(6434), pp. 1463–1467. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaw1219>.

de Rooij, D.G. (1973) 'Spermatogonial Stem Cell Renewal in the Mouse: I. Normal Situation', *Cell Proliferation*, 6(3), pp. 281–287. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1973.tb01617.x>.

de Rooij, D.G. (1998) 'Stem cells in the testis', *International Journal of Experimental Pathology*, 79(2), pp. 67–80. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1998.00057.x>.

Rooij, D.G. de (2017) 'The nature and dynamics of spermatogonial stem cells', *Development*, 144(17), pp. 3022–3030. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.146571>.

Rossetto, D. *et al.* (2010) 'Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(18), pp. 4543–4552. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0513>.

Russell, L.D. *et al.* (1990) 'Histological and Histopathological Evaluation of the Testis', *International Journal of Andrology*, 16(1), pp. 83–83. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x>.

Sachs, C. *et al.* (2014) 'Evaluation of candidate spermatogonial markers ID4 and GPR125 in testes of adult human cadaveric organ donors', *Andrology*, 2(4), pp. 607–614. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00226.x>.

Sada, A. *et al.* (2009) 'The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells', *Science (New York, N.Y.)*, 325(5946), pp. 1394–1398. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1172645>.

Sadate-Ngatchou, P.I. *et al.* (2008) 'Cre recombinase activity specific to postnatal, premeiotic male germ cells in transgenic mice', *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 46(12), pp. 738–742. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvg.20437>.

Sadri-Ardekani, H. *et al.* (2009) 'Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro', *JAMA*, 302(19), pp. 2127–2134. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1689>.

Saitou, M., Kagiwada, S. and Kurimoto, K. (2012) 'Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells', *Development (Cambridge, England)*, 139(1), pp. 15–31. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.050849>.

Saitou, M. and Yamaji, M. (2012) 'Primordial Germ Cells in Mice', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), p. a008375. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375>.

Sancar, A. *et al.* (2004) 'Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints', *Annual Review of Biochemistry*, 73, pp. 39–85. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>.

Sarno, F., Nebbioso, A. and Altucci, L. (2019) 'DOT1L: a key target in normal chromatin remodelling and in mixed-lineage leukaemia treatment', *Epigenetics*, 15(5), pp. 439–453. Available at: <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1699991>.

Schmidt, J.A. *et al.* (2009) 'Identification of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Regulated Genes Important for Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in the Rat', *Biology of Reproduction*, 81(1), pp. 56–66. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075358>.

Schofield, R. (1978) 'The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell', *Blood Cells*, 4(1–2), pp. 7–25.

Schrans-Stassen, B.H.G.J. *et al.* (1999) 'Differential Expression of c-kit in Mouse Undifferentiated and Differentiating Type A Spermatogonia', *Endocrinology*, 140(12), pp. 5894–5900. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7172>.

Schulze, J.M. *et al.* (2009) 'Linking cell cycle to histone modifications: SBF and H2B monoubiquitination machinery and cell cycle regulation of H3K79 dimethylation', *Molecular cell*, 35(5), pp. 626–641. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.017>.

Schwertman, P., Bekker-Jensen, S. and Mailand, N. (2016) 'Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(6), pp. 379–394. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.58>.

Scully, R. *et al.* (2019) 'DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(11), pp. 698–714. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>.

Seandel, M. *et al.* (2007) 'Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors', *Nature*, 449(7160), pp. 346–350. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature06129>.

Sha, L. *et al.* (2020) 'Insights on the regulation of the MLL/SET1 family histone methyltransferases', *Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1863(7), p. 194561. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194561>.

Shahbazian, M.D., Zhang, K. and Grunstein, M. (2005) 'Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1', *Molecular Cell*, 19(2), pp. 271–277. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.010>.

Shami, A.N. *et al.* (2020) 'Single-cell RNA sequencing of human, macaque, and mouse testes uncovers conserved and divergent features of mammalian spermatogenesis', *Developmental cell*, 54(4), pp. 529-547.e12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.010>.

Shan, Y. *et al.* (2017) 'PRC2 specifies ectoderm lineages and maintains pluripotency in primed but not naïve ESCs', *Nature Communications*, 8(1), p. 672. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00668-4>.

Shanower, G.A. *et al.* (2005) 'Characterization of the grappa Gene, the Drosophila Histone H3 Lysine 79 Methyltransferase', *Genetics*, 169(1), pp. 173–184. Available at: <https://doi.org/10.1534/genetics.104.033191>.

Sharma, R. (2013) 'Spermatogenesis: An Overview', *Sperm Chromatin for the Researcher* [Preprint]. Available at: [https://www.academia.edu/11255286/Spermatogenesis\\_An\\_Overview](https://www.academia.edu/11255286/Spermatogenesis_An_Overview) (Accessed: 2 October 2022).

Shinohara, T. *et al.* (2000) 'Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), pp. 8346–8351.

Shinohara, T., Avarbock, M.R. and Brinster, R.L. (1999) 'beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells', *Proceedings of the National Academy of*

*Sciences of the United States of America*, 96(10), pp. 5504–5509. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5504>.

Sidoli, S., Cheng, L. and Jensen, O.N. (2012) 'Proteomics in chromatin biology and epigenetics: Elucidation of post-translational modifications of histone proteins by mass spectrometry', *Journal of Proteomics*, 75(12), pp. 3419–3433. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.029>.

Singer, M.S. *et al.* (1998) 'Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Genetics*, 150(2), pp. 613–632.

Sohni, A. *et al.* (2019a) 'The Neonatal and Adult Human Testis Defined at the Single-Cell Level', *Cell Reports*, 26(6), pp. 1501-1517.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.045>.

Sohni, A. *et al.* (2019b) 'The Neonatal and Adult Human Testis Defined at the Single-Cell Level', *Cell Reports*, 26(6), pp. 1501-1517.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.045>.

Srinivas, U.S. *et al.* (2018) 'ROS and the DNA damage response in cancer', *Redox Biology*, 25, p. 101084. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>.

Ståhl, P.L. *et al.* (2016) 'Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics', *Science (New York, N.Y.)*, 353(6294), pp. 78–82. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaf2403>.

Sun, F. *et al.* (2015) 'Id4 Marks Spermatogonial Stem Cells in the Mouse Testis', *Scientific Reports*, 5(1), p. 17594. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep17594>.

Suzuki, H. *et al.* (2012) 'SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation', *Developmental biology*, 361(2), pp. 301–312. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.027>.

Takahashi, K. *et al.* (2012) 'Thrombospondin-1 acts as a ligand for CD148 tyrosine phosphatase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), pp. 1985–1990. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106171109>.

Takashima, S. *et al.* (2013) 'Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1', *Genes & Development*, 27(18), pp. 1949–1958. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.220194.113>.

Tan, K. *et al.* (2020) 'Transcriptome profiling reveals signaling conditions dictating human spermatogonia fate in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(30), pp. 17832–17841. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2000362117>.

Tan, Y. *et al.* (2013) 'Acetylated histone H3K56 interacts with Oct4 to promote mouse embryonic stem cell pluripotency', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), pp. 11493–11498. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1309914110>.

Tanaka, S.S. *et al.* (2000) 'The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells', *Genes & Development*, 14(7), pp. 841–853.

Tanaka, T. *et al.* (2015) 'Pluripotent cell derivation from male germline cells by suppression of Dmrt1 and Trp53', *The Journal of Reproduction and Development*, 61(5), pp. 473–484. Available at: <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-059>.

Tang, M. *et al.* (2019) 'SIRT7-mediated ATM deacetylation is essential for its deactivation and DNA damage repair', *Science Advances*, 5(3), p. eaav1118. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav1118>.

Tegelenbosch, R.A. and de Rooij, D.G. (1993) 'A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse', *Mutation Research*, 290(2), pp. 193–200.

Thiel, A.T. *et al.* (2010) 'MLL-AF9-Induced Leukemogenesis Requires Coexpression of the Wild-Type Mll Allele', *Cancer Cell*, 17(2), pp. 148–159. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.034>.

Tie, F. *et al.* (2014) 'Trithorax monomethylates histone H3K4 and interacts directly with CBP to promote H3K27 acetylation and antagonize Polycomb silencing', *Development (Cambridge, England)*, 141(5), pp. 1129–1139. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.102392>.

Toh, G.W.-L. *et al.* (2006) 'Histone H2A phosphorylation and H3 methylation are required for a novel Rad9 DSB repair function following checkpoint activation', *DNA Repair*, 5(6), pp. 693–703. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.03.005>.

Tomizawa, S. *et al.* (2018) 'Kmt2b conveys monovalent and bivalent H3K4me3 in mouse spermatogonial stem cells at germline and embryonic promoters', *Development*, 145(23), p. dev169102. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.169102>.

Toyoda, S. *et al.* (2009) 'Sohlh2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia', *Developmental Biology*, 325(1), pp. 238–248. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.019>.

Tran, V. *et al.* (2012) 'Asymmetric division of Drosophila male germline stem cell shows asymmetric histone distribution', *Science (New York, N.Y.)*, 338(6107), pp. 679–682. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1226028>.

Valencia-Sánchez, M.I. *et al.* (2021) 'Regulation of the Dot1 histone H3K79 methyltransferase by histone H4K16 acetylation', *Science (New York, N.Y.)*, 371(6527), p. eabc6663. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abc6663>.

Valko, M. *et al.* (2006) 'Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer', *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), pp. 1–40. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.

Valli, H. *et al.* (2014) 'Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells', *Fertility and Sterility*, 102(2), pp. 566–580.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.036>.

Vaquero, A. *et al.* (2004) 'Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin', *Molecular Cell*, 16(1), pp. 93–105. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.031>.

Voigt, P., Tee, W.-W. and Reinberg, D. (2013) 'A double take on bivalent promoters', *Genes & Development*, 27(12), pp. 1318–1338. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.219626.113>.

Waddington, C. (1939) 'An Introduction to Modern Genetics. By C. H. Waddington', *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, 14(4–6), pp. 82–82. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1939.tb00039.x>.

Wakeman, T.P. *et al.* (2012) 'Bat3 facilitates H3K79 dimethylation by DOT1L and promotes DNA damage-induced 53BP1 foci at G1/G2 cell-cycle phases', *The EMBO journal*, 31(9), pp. 2169–2181. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.50>.

Wan, L. *et al.* (2017) 'ENL links histone acetylation to oncogenic gene expression in acute myeloid leukaemia', *Nature*, 543(7644), pp. 265–269. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature21687>.

- Wang, C. *et al.* (2016) 'Enhancer priming by H3K4 methyltransferase MLL4 controls cell fate transition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), pp. 11871–11876. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1606857113>.
- Wang, M. *et al.* (2018) 'Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals Sequential Cell Fate Transition during Human Spermatogenesis', *Cell Stem Cell*, 23(4), pp. 599-614.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.08.007>.
- Wang, Z. *et al.* (2009) 'Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes', *Cell*, 138(5), pp. 1019–1031. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.049>.
- Weber, S. *et al.* (2010) 'Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance', *Biology of Reproduction*, 82(1), pp. 214–223. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078717>.
- Western, P.S. *et al.* (2008) 'Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(2), pp. 339–347. Available at: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622>.
- Whittle, C.A. and Extavour, C.G. (2017) 'Causes and evolutionary consequences of primordial germ-cell specification mode in metazoans', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(23), pp. 5784–5791. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1610600114>.
- Willingham, S.B. *et al.* (2012) 'The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), pp. 6662–6667. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1121623109>.
- Wood, K., Tellier, M. and Murphy, S. (2018) 'DOT1L and H3K79 Methylation in Transcription and Genomic Stability', *Biomolecules*, 8(1), p. 11. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom8010011>.
- Wu, X. *et al.* (2009) 'Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), pp. 21672–21677. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0912432106>.

- Wysocki, R. *et al.* (2005) 'Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9', *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), pp. 8430–8443. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8430-8443.2005>.
- Yamashita, Y.M., Jones, D.L. and Fuller, M.T. (2003) 'Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome', *Science (New York, N.Y.)*, 301(5639), pp. 1547–1550. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1087795>.
- Yang, Q.-E. *et al.* (2013) 'CXCL12–CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells', *Journal of Cell Science*, 126(4), pp. 1009–1020. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.119826>.
- Yao, T. *et al.* (2019) 'Structural basis of the crosstalk between histone H2B monoubiquitination and H3 lysine 79 methylation on nucleosome', *Cell Research*, 29(4), pp. 330–333. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0146-7>.
- Yatabe, Y., Tavaré, S. and Shibata, D. (2001) 'Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp. 10839–10844. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.191225998>.
- Yeh, J.R., Zhang, X. and Nagano, M.C. (2011) 'Wnt5a is a cell-extrinsic factor that supports self-renewal of mouse spermatogonial stem cells', *Journal of Cell Science*, 124(Pt 14), pp. 2357–2366. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.080903>.
- Yokoyama, A. *et al.* (2010) 'A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription', *Cancer Cell*, 17(2), pp. 198–212. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.040>.
- Yoshida, S. *et al.* (2006) 'The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage', *Development (Cambridge, England)*, 133(8), pp. 1495–1505. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.02316>.
- Yoshida, S. (2018) 'Open niche regulation of mouse spermatogenic stem cells', *Development, Growth & Differentiation*, 60(9), pp. 542–552. Available at: <https://doi.org/10.1111/dgd.12574>.
- Yoshida, S. (2019) 'Chapter Seven - Heterogeneous, dynamic, and stochastic nature of mammalian spermatogenic stem cells', in R. Lehmann (ed.) *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press (The Immortal Germline), pp. 245–285. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.04.008>.

- Yoshida, S., Sukeno, M. and Nabeshima, Y.-I. (2007) 'A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis', *Science (New York, N.Y.)*, 317(5845), pp. 1722–1726. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1144885>.
- Yuan, W. *et al.* (2011) 'H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(10), pp. 7983–7989. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194027>.
- Zang, Z.J. *et al.* (2017) 'Transplantation of CD51+ Stem Leydig Cells: A New Strategy for the Treatment of Testosterone Deficiency', *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 35(5), pp. 1222–1232. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.2569>.
- Zhang, T. *et al.* (2016) 'DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment', *PLoS genetics*, 12(9), p. e1006293. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006293>.
- Zhang, T. and Zarkower, D. (2017) 'DMRT proteins and coordination of mammalian spermatogenesis', *Stem cell research*, 24, pp. 195–202. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.07.026>.
- Zheng, K. *et al.* (2009) 'The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse', *BMC developmental biology*, 9, p. 38. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-38>.
- Zhou, W. *et al.* (2015) 'PTEN signaling is required for the maintenance of spermatogonial stem cells in mouse, by regulating the expressions of PLZF and UTF1', *Cell & Bioscience*, 5(1), p. 42. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0034-x>.
- Zhu, B. *et al.* (2018) 'The protective role of DOT1L in UV-induced melanomagenesis', *Nature Communications*, 9(1), p. 259. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02687-7>.
- Zhu, J. (2018) 'Csk/CD148 and platelet SFK activation: a balancing act!', *Blood*, 131(10), pp. 1042–1043. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-826438>.
- Zohni, K. *et al.* (2012) 'The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(1), pp. 44–53. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/der357>.



**Titre :** Caractérisation des cellules souches germinales : étude phénotypique chez l'Homme et rôle de la méthyltransférase DOT1L

**Mots clés :** Cellules souches – spermatogenèse – autorenouvellement – humain

**Résumé :** La spermatogenèse assure dès la puberté la production de spermatozoïdes à partir d'un nombre restreint de cellules souches germinales (CSGs). La régulation aberrante des mécanismes d'autorenouvellement/différenciation des CSGs peut entraîner soit la perte du pool de cellules souches et une infertilité, soit une prolifération cellulaire incontrôlée pouvant être à l'origine de tumeurs germinales. Le développement de nouvelles technologies en reproduction humaine est nécessaire afin d'apporter des solutions curatives aux troubles de la fertilité consécutifs aux traitements anticancéreux, responsable de l'atteinte du stock de CSGs. Bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires de régulation des CSGs chez les organismes modèles et la souris, comprendre l'interaction complexe des réseaux de régulation au cours du développement de la lignée germinale reste un défi majeur chez l'Homme. L'identité du pool de CSGs humaines et les mécanismes moléculaires gouvernant leur autorenouvellement restent peu connus malgré les récents progrès réalisés grâce aux approches par scRNAseq. Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation des cellule souches germinales.

Une première partie de mon travail de thèse a consisté à développer un nouveau panel de 14 marqueurs cellulaires permettant par cytométrie spectrale de mieux décrire et résoudre la complexité de la population de spermatogonies primitives humaines, contenant les cellules souches et les progéniteurs spermatogoniaux immatures. Dans une seconde partie, j'ai étudié le rôle de l'histone méthyltransférase DOT1L dans la régulation du destin des CSGs dans un modèle murin d'inactivation conditionnelle de *Dot1l* dans le lignage germinale. Nous observons notamment chez ces souris déficientes pour *Dot1l* une diminution du pool de cellules souches germinales, un déficit fonctionnel de ces cellules, et un défaut de différenciation dans la population de spermatogonie indifférenciées, évoquant un vieillissement prématuré de ces progéniteurs immatures. Dans les souris âgées de plus d'un an, on observe une accumulation anormale des spermatogonies indifférenciées, soulignant un problème de différenciation des progéniteurs immatures. Ces données soulignent le rôle des modulateurs épigénétiques en tant qu'acteur majeur dans les prises de décision des cellules souches quant à leur destin cellulaire.