



HAL
open science

Exploration tridimensionnelle des aspects dynamiques de l'ovogenèse et de sa régulation par le miR-202 chez le médaka *Oryzias latipes*

Manon Lesage

► To cite this version:

Manon Lesage. Exploration tridimensionnelle des aspects dynamiques de l'ovogenèse et de sa régulation par le miR-202 chez le médaka *Oryzias latipes*. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB002 . tel-04136209

HAL Id: tel-04136209

<https://theses.hal.science/tel-04136209>

Submitted on 21 Jun 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : « *Biologie Cellulaire, Biologie du Développement* »

Par

Manon LESAGE

Exploration tridimensionnelle des aspects dynamiques de l'ovogenèse et de sa régulation par le miR-202 chez le médaka *Oryzias latipes*

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 26 Janvier 2023

Unité de recherche : INRAe UR 1037 - Laboratoire de Physiologie et de Génomique des Poissons (LPGP)

Rapporteurs avant soutenance :

Nadine Peyrieras	Directrice de Recherche, UMR CNRS 7057 (MSC)
Frédérique Clément	Directrice de Recherche, INRIA Centre Saclay–Île-de-France (MUSCA)

Composition du Jury :

Président :

Gilles Salbert	Professeur des Universités, Université de Rennes, UMR 6290 CNRS (IGDR)
----------------	--

Examineurs :

Hervé Seitz	Directeur de Recherche, UMR CNRS 9002 (IGH)
Svetlana Uzbekova	Chargée de Recherche, UMR INRAe 7247 (PRC)
Nadine Peyrieras	Directrice de Recherche, UMR CNRS 7057 (MSC)
Frédérique Clément	Directrice de Recherche, INRIA Centre Saclay–Île-de-France (MUSCA)

Dir. de thèse :

Violette Thermes	Chargée de recherche (HDR), UR INRAe 1037 (LPGP)
------------------	--

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté de porter leur regard sur ce travail de thèse, Nadine Peyrieras, Frédérique Clément, Svetlana Uzbekova, Hervé Seitz et Gilles Salbert.

Nombreuses sont les personnes qui m'ont accompagnées pendant ces travaux et je tiens à tous vous remercier chaleureusement. Je commencerai, évidemment, par une mention particulière à la *dreamteam* de l'ovaire sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour.

Violette, merci infiniment de m'avoir donné cette chance de travailler avec toi, d'abord en stage puis pendant ces années de thèse. Merci d'avoir toujours essayé de booster ma confiance et de m'avoir transmis ton expérience, tes conseils avisés et surtout d'avoir supporté mes nombreux états d'âme. Je n'aurais pu avoir de meilleur mentor, ton humanité et ta compréhension sont précieuses et m'ont permis d'avancer même dans les moments les plus durs.

Steph, les mots me manquent pour exprimer toute ma gratitude. Tu m'as accompagnée depuis le premier jour, les premières expériences depuis mon stage et tu m'as tant appris. Merci d'avoir été là pour m'aider si souvent, merci pour ta bienveillance et ton enthousiasme. Je n'ai jamais su égaler ton rythme et ta productivité et tu resteras un exemple à suivre pour le reste de ma carrière.

Manon, je te remercie d'avoir tant contribué à ces travaux. Sans toutes ces heures à bichonner nos petits ovaires, rien n'aurait pu aboutir. Merci d'avoir concilié les emplois du temps pour me laisser un maximum de temps au microscope, d'avoir pris le temps d'investiguer sur les problèmes de marquages, de décalages et autres. Merci pour ta gentillesse, et surtout, d'avoir partagé la confusion des collègues entre Manon T. ou L. jusqu'au bout.

Je remercie également la team analyse d'image et *baby-deep-learning* du labo, essentiellement composée de Jérôme B., Violette et Thierry. Merci Jérôme de nous avoir accompagnées dans ce challenge avec Violette, ton expertise a été précieuse et nous n'aurions peut-être pas sauté le pas sans toi. Merci à vous deux de vous être investis dans les macros et merci violette d'avoir partagé la lourde tâche d'analyse d'image de tous ces ovaires. Amusez-vous bien avec la nouvelle bête 🐾 ! Un grand merci également à Thierry qui nous a beaucoup aidé à trouver notre bonheur sur Fiji, partagé son expertise et régale la communauté avec ses formations.

Merci à toute l'équipe des IE qui s'occupent à plein temps de nos médakas et qui ont su s'adapter pour la mise en place des multiples manip de phénotypage repro. Merci en particulier à Cécile et Guillaume pour le suivi de nos lignées et leur flexibilité.

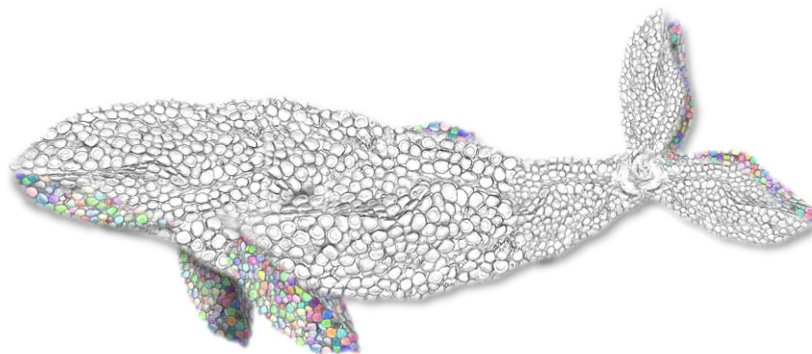
Je remercie également ceux qui ont contribué ou contribuent à la suite de ces travaux, en particulier à Sully pour ses codes Python, R et toutes ces versions de graphiques qu'on a pu te demander, que tu as fourni sans broncher (ou juste un peu). Merci à Thao d'avoir mis ses talents à contribution pour l'extraction de ces mini ovaires qui je l'espère, donneront des données prometteuses. Merci à Julien d'avoir contribué à ce projet, d'avoir accepté de co-diriger cette thèse dans ses premières années et d'avoir partagé ses bons plans palettes et bricolage.

Un grand merci à tous les collègues du laboratoire avec qui j'ai pu échanger et partager de bons moments, des rires, des potins en tous genres. Pour ne pas faire trop de jaloux et éviter d'écrire 10 pages, je ne pourrais vous citer tous, mais sachez que chacun a apporté sa touche personnelle à cet environnement pour le rendre plus agréable, et je vous en remercie.

Je ne peux terminer ces mots sans adresser mes remerciements à mes collègues-amis doctorants, les anciens comme les nouveaux, pour tous les souvenirs qui resteront gravés. Ma gratitude revient particulièrement, sans surprise, à Aude qui m'a vu dans tous mes états, a supporté de cohabiter avec moi pendant l'année la plus dure mentalement tout en partageant gracieusement ses talents de cuisinière. Ton soutien a toujours été rassurant, tes histoires tellement passionnantes (ou au moins drôles) et c'était un plaisir, que dis-je, un honneur, d'avoir synchronisé nos crises de nerfs mais aussi d'avoir partagé tant de bons moments que je ne compte plus. Maxime, je te lègue le titre de chef du bureau, tu l'as bien mérité. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de nos délires les plus bizarres aux pires moments de stress et de ruminations. Antoine, merci pour ton soutien dans certains moments difficiles, d'avoir contribué à ma survie pendant le confinement, de m'avoir fait confiance et l'honneur de m'occuper de Bibi. Constance, mon apprentie grimpeuse très proche de rattraper son maître, merci de m'avoir accompagnée tant de fois et écouté mes merveilleux conseils de coach, merci pour ton enthousiasme quotidien et nos nombreuses récompenses post-effort. Merci à tous les autres pour leur bonne humeur et tous ces moments qu'on a partagé aux repas, pauses café, soirées, brunch... Tout ça peut paraître anodin mais a énormément contribué à faire de ces années une belle expérience.

Enfin, un grand merci à ma famille à qui je n'ai pu consacrer beaucoup de temps ces dernières années. Merci d'avoir été compréhensifs, pour votre soutien et vos efforts pour comprendre mon travail. Merci en particulier à mes parents de m'avoir permis et encouragée à poursuivre ma formation.

À Bernard et Monique,



Sommaire

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	5
INTRODUCTION.....	7
INTRODUCTION GENERALE	9
1. <i>Fécondité et stratégies de reproduction chez les téléostéens</i>	9
1.1 Caractéristiques générales du médaka, <i>Oryzias latipes</i>	10
1.1.1 Cycle de vie du médaka.....	11
1.1.2 Cycle de reproduction du médaka.....	11
2. <i>La fécondité peut fluctuer en fonction de nombreux paramètres</i>	12
PARTIE I – DEVELOPPEMENT OVARIEN ET OVOGENESE	14
1. <i>Développement de la gonade.....</i>	14
1.1 Développement de la gonade primordiale.....	14
1.1.1 Origine et migration des cellules germinales.....	14
1.1.2 Division des cellules germinales.....	16
1.1.3 Précurseurs des cellules somatiques gonadiques	17
1.2 Organisation structurelle de l’ovaire et formation des follicules.....	18
1.2.1 D’une structure commune à une morphologie différenciée	18
1.2.2 Emergence des follicules à partir des cordons germinatifs.....	21
1.3 Recrutement des cellules folliculaires	22
2. <i>Les stades de l’ovogenèse.....</i>	23
2.1 Pré-vitellogenèse.....	24
2.1.1 Les stades de la pré-vitellogenèse chez le médaka.....	25
2.1.2 Mécanismes majeurs mis en place et régulation de la croissance primaire.....	25
2.2 Vitellogenèse	27
2.2.1 Les stades de la vitellogenèse chez le médaka	27
2.2.2 Quelques caractéristiques de la croissance secondaire.....	27
2.3 Post-vitellogenèse.....	28
2.3.1 Les stades de la post-vitellogenèse chez le médaka.....	28
2.3.2 Facteurs impliqués dans la maturation finale	28
PARTIE II : REGULATION DE L’OVOGENESE AU COURS DU CYCLE DE VIE	30
1. <i>Déterminants majeurs de la régulation de l’ovogenèse : quelques exemples</i>	30
1.1 Régulation du développement ovarien et de la croissance des follicules.....	30
1.1.1 Prolifération des cellules germinales	30
1.1.2 Rôle de la voie de signalisation TGF- β dans la croissance folliculaire.....	31
1.2 Régulation hormonale et axe gonado-pituitaire.....	32
1.2.1 L’aromatase et le rôle des œstrogènes	33

1.2.2	Le rôle majeur des gonadotropines	34
2.	<i>Rôle des microARNs dans le processus de régulation des gènes contrôlant la fécondité</i>	35
2.1	Généralités sur les microARNs.....	36
2.1.1	Définition et mécanismes généraux de biogenèse.....	36
2.1.2	Mécanismes de ciblage des gènes	36
2.1.3	Méthodes de validation de gènes cibles	37
2.2	Rôle des miRs dans l'ovogenèse.....	39
2.3	Cas particulier du miR-202.....	39
2.3.1	Expression spatiale, temporelle et conservation.....	39
2.3.2	Rôles potentiels du miR-202 dans différents tissus.....	41
2.3.3	Rôles et gènes cibles potentiels dans l'ovogenèse chez les téléostéens	42
2.3.4	Un rôle majeur dans l'ovogenèse à explorer.....	43
PARTIE III : ASPECTS DYNAMIQUES DE L'OVOGENESE.....		45
1.	<i>Classifications de l'ovaire pour l'évaluation de la fécondité</i>	45
1.1	Types de synchronisme de ponte et de croissance ovocytaire	45
1.2	Fécondité déterminée ou indéterminée.....	49
1.3	Evolution des conceptions et avantage du modèle de laboratoire	50
2.	<i>Modalités de réarrangements du contenu ovarien</i>	51
2.1	Les différents types de recrutements	51
2.1.1	Recrutement de follicules en croissance et formation du batch de ponte.....	51
2.1.2	Recrutement de follicules néo-formés	52
2.2	Rôle de l'atrésie et perturbations de la dynamique ovarienne.....	53
2.2.1	Apoptose et atrésie folliculaire	53
2.2.2	Modification de la dynamique ovarienne.....	53
3.	<i>Méthodes d'analyse du développement et du contenu ovarien</i>	55
3.1	De l'analyse de sous-volumes à la visualisation 3D de l'ovaire intact.....	55
3.1.1	Histologie et microscopie 2D, dissociation de follicules.....	55
3.1.2	La microscopie 3D comme outil d'exploration des ovaires entiers.....	56
3.2	Evolution des méthodes d'analyse d'images pour la quantification d'images 3D	57
3.2.1	Méthodes d'analyse d'images « classiques »	57
3.2.2	Méthodes modernes d'analyse par intelligence artificielle	58
OBJECTIFS		60
RESULTATS.....		62
<i>Chapitre I.....</i>		<i>63</i>
<i>Développement de nouvelles méthodes d'analyse 3D pour l'exploration du contenu de l'ovaire entier.....</i>		<i>63</i>
Résumé de chapitre		63
Article 1 : C-ECi: a CUBIC-ECi combined clearing method for three-dimensional follicular content analysis in the fish ovary†		65
Résumé 65		

Article 2 : An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of Medaka ovaries	79
Résumé 79	
ABSTRACT	82
INTRODUCTION.....	83
MATERIAL AND METHODS.....	84
RESULTS.....	88
DISCUSSION.....	99
Conclusion	101
REFERENCES.....	103
<i>Chapitre II</i>	106
<i>Développement de l'ovaire, dynamique de l'ovogenèse et régulation par le miR-202</i>	106
Résumé de chapitre	106
Matériel et Méthode.....	108
Ethique, élevage des animaux et suivi de ponte	108
Echantillonnage des ovaires à différents stades de développement	108
Traitement des échantillons et microscopie confocale.....	109
Analyse d'images.....	109
Analyse statistique	110
Partie I : Nouvelles données de compréhension de la dynamique de l'ovogenèse à différents temps chez le médaka.....	111
1. Développement de l'ovaire jusqu'à maturité des femelles	111
2. Dynamique de la folliculogenèse au cours du cycle de vie.....	113
3. Dynamique de la croissance folliculaire au cours du cycle de reproduction de 24h	118
4. Synthèse des résultats.....	120
Partie II : Régulation de la dynamique ovarienne par le miR-202 au cours du temps	121
1. Cinétique d'expression du miR-202 dans l'ovaire en croissance	121
2. Analyse du rôle du miR-202 dans la morphogenèse de l'ovaire	122
3. Distribution folliculaire et capacités de prolifération des cellules somatiques chez les larves mutantes <i>miR-202</i>	124
4. Analyse de la fréquence de distribution des follicules en fin de période de croissance	126
5. Régulation de la folliculogenèse et la fécondité par le miR-202 à l'âge adulte	128
6. Synthèse des résultats.....	132
DISCUSSION GENERALE	134
<i>Précision des données obtenues</i>	135
<i>Régulation de la formation et la croissance des follicules au cours du cycle de vie</i>	137
1. La phase de reproduction active entraîne une perte progressive du stock de follicules	137
2. La formation du stock folliculaire global ne semble pas régulée par le miR-202.....	138

3.	La mise en place de l'asynchronie de croissance folliculaire est nettement contrôlée dans le temps et dépend de la photopériode.....	139
3.1	La période de croissance sous photopériode courte entraîne une accumulation de follicules relativement synchronisés.....	140
3.2	L'organisation de l'ovaire devient fortement asynchrone avec la poursuite de la vitellogenèse sous une photopériode longue.....	140
3.3	Mise en place progressive de la capacité de ponte optimale.....	141
	<i>Dynamique de recrutement et conséquences sur la fécondité.....</i>	<i>142</i>
1.	Formation cyclique du batch de ponte à intervalle court et sa régulation précise dans le temps.....	142
1.1	Rythme de recrutement du batch de ponte.....	142
1.2	Le rôle du miR-202 déterminant pour la fécondité serait en amont du recrutement du batch 143	
2.	Deux points de recrutement distincts chez la femelle immature et en cours de reproduction.....	143
2.1	Activation de la croissance folliculaire ou levée de dormance.....	143
2.2	Un second recrutement effectue la transition entre la croissance primaire et secondaire.....	144
3.	Le miR-202 est impliqué dans la régulation des recrutements de follicules en croissance primaire et secondaire.....	146
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	149
	REFERENCES.....	152
	ANNEXES.....	171
	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	188

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la migration des cellules germinales dans les embryons de médaka.....	15
Figure 2 : Deux types de prolifération des cellules germinales se produisent pendant la différenciation sexuelle chez le médaka.....	17
Figure 3: Représentation schématique de 2 précurseurs somatiques gonadiques distincts dans les embryons de médaka. Coupe transversale d'un embryon au stade 30.	18
Figure 4: L'unité commune aux testicules et aux ovaires maintient les cellules souches germinales chez le médaka.	20
Figure 5: Représentation schématique du développement des cellules germinales dans le germinal cradle.	21
Figure 6: Processus de développement possible des lignées de cellules thécales dans la gonade femelle en développement.....	22
Figure 7 : Morphogenèse ovarienne chez le médaka.....	23
Figure 8 : Illustration schématique des ovocytes en cours de croissance à différents stades de l'ovogenèse..	26
Figure 9: Types d'organisation de l'ovaire chez les poissons téléostéens.....	47
Figure 10: Deux modèles de dynamique de croissance différents chez le médaka retrouvés dans la littérature.	48
Figure 11: Paramètres caractéristiques de la fécondité chez les poissons téléostéens.	49
Figure 12 : Graphical abstract- CUBIC-ECi (C-ECi) clearing for 3D quantitative analysis of the medaka ovarian content	68
Figure 13: Assessment of the transparency of adult medaka treated with different clearing methods	69
Figure 14: Combining CUBIC and ECi methods efficiently improve follicular staining in the whole medaka ovary...71	71
Figure 15 : 3D imaging of a C-ECi cleared medaka ovary.....	72
Figure 16 : 3D follicular content analysis in the adult medaka ovary.....	73
Figure 17 : 3D imaging and 3D analysis of a portion of trout ovary after C-ECi clearing.....	75
Figure 18: Pipeline overview for 3D image analysis of the whole ovary at larvae and adult stages.....	89
Figure 19 : 3D reconstruction of whole medaka ovaries.....	91
Figure 20 : Image pre-processing for enhancement of features detection through larva ovary depth.....	92
Figure 21 Image pre-processing for enhancement of features detection through adult ovary depth.....	93
Figure 22: Effect of image pre-processing on Cellpose 3D segmentation efficiency	95
Figure 23 : Post-processing corrections of segmented labels.....	96
Figure 24 3D Qualitative spatial visualization and quantitative analysis of ovarian content.....	98
Figure 25 : Dynamique de croissance ovarienne au cours du cycle de vie du médaka.....	112
Figure 26 : Evolution de la distribution des follicules dans l'ovaire au cours du cycle de vie.....	115
Figure 27 : Evolution des profils d'enrichissement de follicules à différents stades de l'ovogenèse au cours de la transition entre la période de croissance et de reproduction.	116
Figure 28 : Dynamique de l'ovogenèse au cours du cycle de reproduction de 24h du médaka.	119
Figure 29: Expression du miR-202 dans l'ovaire au cours du développement précoce du médaka.....	122

Figure 30 : Développement de l'ovaire au cours du temps chez les femelles miR-202-KO.....	123
Figure 31: Formation et croissance primaire des follicules chez la larve miR-202-KO.....	125
Figure 32: Dynamique de la croissance folliculaire chez les femelles juvéniles miR-202-KO.....	127
Figure 33: Dynamique de folliculogénèse chez les femelles adultes miR-202-KO après la ponte (T0).	130
Figure 34: Dynamique de folliculogénèse chez les femelles adultes miR-202-KO avant la ponte (T4).	131
Figure 35 : Annexe 1- Table de développement embryonnaire du médaka.....	172
Figure 36 : Annexe 2- Table de développement des ovocytes chez le médaka.....	180
Figure 37: Annexe 3-Courbe de croissance au cours du cycle de vie du médaka.....	182
Figure 38 : Annexe 4- Nombre absolus de follicules par stades de l'ovogénèse et proportions dans les compartiments de pré-vitellogénèse, vitellogénèse, post-vitellogénèse au cours du cycle de vie chez des individus sauvages.....	183
Figure 39 : Annexe 5- Distribution folliculaire par classes de 50 μm au cours d'un cycle de reproduction de 24h chez l'adulte sauvage (pré-vitellogénèse et vitellogénèse).....	184
Figure 40 : Annexe 6- Distributions folliculaires par stades de l'ovogénèse et variabilité inter-individuelle à T0 chez la lignée sauvage et miR-202-KO.....	185
Figure 41 : Annexe 7- Distributions folliculaires par stades de l'ovogénèse et variabilité inter-individuelle à T4 chez la lignée sauvage et miR-202-KO.....	185
Figure 42 : Figure supplémentaire de l'article 2- An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of Medaka ovaries.....	187

INTRODUCTION

Introduction générale

Les mécanismes de la reproduction sont étudiés aujourd'hui dans de nombreux contextes de recherche fondamentale ou appliquée. Ils représentent en effet, que la reproduction soit sexuée ou non, un phénomène clé dans la création et la perpétuation de toute forme de vie connue. Beaucoup étudiée chez les mammifères pour son application en biologie médicale, la reproduction est aussi aujourd'hui mieux comprise chez de nombreux organismes pluricellulaires. Les poissons téléostéens (ou poissons osseux), regroupant plus de 90% des espèces de poissons connus (Volf 2005), constituent une importante ressource pour l'étude de l'évolution des mécanismes de reproduction chez les vertébrés. Les recherches sur cette grande diversité d'espèces ont largement augmenté les connaissances concernant les stratégies de reproduction en halieutique ou pour l'aquaculture (Jalabert 2005), mais ont aussi contribué à la compréhension générale de certains mécanismes d'adaptation à l'environnement ou des mécanismes clés de la formation des gamètes. Parmi les téléostéens, certaines espèces ont suscité un intérêt particulier en raison de leurs caractéristiques avantageuses (génomique, élevage, stratégie de reproduction...) et sont aujourd'hui des animaux « modèles » pour l'étude des mécanismes contrôlant la fécondité.

Chez les vertébrés, bien qu'une reproduction asexuée existe chez de rares espèces, la majorité des espèces se reproduisent de manière sexuée et nécessitent ainsi la présence de deux individus reproductivement matures (Neaves et Baumann 2011). Cette stratégie de reproduction est fondée sur un nombre effarant de mécanismes passant par la formation de cellules spécialisées femelles ou mâles dans les gonades jusqu'à la fécondation (union des cellules mâle et femelle) et la formation de nouveaux individus (zygote ou embryon). La reproduction sexuée regroupe elle-même différents types de stratégies selon les modes de fécondation (interne ou externe à l'individu), ou le mode de développement de l'embryon (ovipare, ovovivipare, vivipare). Chez les poissons téléostéens, la majorité des espèces sont ovipares et à fécondation externe, c'est-à-dire réalisant une fécondation des œufs en dehors du corps de la femelle, avec un développement embryonnaire sous dépendance des réserves accumulées dans l'œuf.

1. Fécondité et stratégies de reproduction chez les téléostéens

La fécondité peut se définir par le nombre d'œufs pondus par ponte ou sur une période de reproduction complète, la fréquence de ponte et la viabilité des œufs. D'autres définitions considèrent une fécondité relative, exprimée en nombre d'œufs ovulés par unité (kg) de poids du corps (Tyler et Sumpter 1996). Dans cette thèse, je me référerai exclusivement à la première définition. Le groupe des poissons téléostéens regroupe un nombre conséquent d'espèces présentant des stratégies de reproduction et des niveaux de fécondité extrêmement variés. La diversité des modes de reproduction peut être associée à la nécessité d'adaptation des téléostéens à des environnements aquatiques variables, que ce soit dans le cas de migrations de certaines espèces au cours de leur cycle de vie ou alors de modifications saisonnières. Cette plasticité concerne ainsi le mode de ponte, le

comportement parental, la morphologie des œufs et leurs mécanismes de formation, mais aussi les types de sexualités et la sensibilité à des facteurs environnementaux (Jalabert 2005). Pour ne citer qu'un exemple, les multiples pontes au cours d'une saison de reproduction peuvent être séparées par des intervalles de longueur variable selon les espèces.

De plus, la fécondité dépend également de la longévité de reproduction, c'est-à-dire la durée pendant laquelle une femelle peut produire des œufs. Certaines femelles ne pondent qu'une fois au cours de leur cycle de vie (sémelpares), un exemple classique est le saumon du Pacifique où une mortalité accrue semble être la conséquence d'un investissement extrême d'énergie pour la reproduction (Morbey, Brassil, et Hendry 2005). Des espèces suivant ce mode de reproduction présentent une organisation synchrone de l'ovaire : tous les ovocytes se développent et ovulent de façon synchronisée. D'autres espèces produiront plusieurs pontes au cours de leur vie (itéropares, aussi appelées « batch spawners »), et peuvent posséder deux organisations types dans l'ovaire (Lowerre-Barbieri et al. 2011). Les groupes-synchrones, plus communs chez les téléostéens, sont globalement composés d'au moins deux groupes d'ovocytes distinguables, avec en général une population d'ovocytes plus larges, et un groupe plus hétérogène de petits ovocytes. Un dernier groupe, les asynchrones, possèdent des ovocytes à tous stades de développement, sans dominance particulière d'un stade de développement (Wallace et Selman 1981; Kestemont et Philippart 1991).

A la différence des mammifères, où la formation des ovogonies a lieu uniquement pendant le développement précoce, une grande partie des téléostéens gardent une capacité de renouvellement des ovogonies afin d'assurer les rythmes saisonniers de reproduction (Kagawa 2013). Des périodes de « régénération » ont ainsi été décrites après la période de ponte (ou régression) (Brown-Peterson et al. 2011). Pour décrire la formation des ovocytes matures, on parle souvent d'une étape de recrutement des ovocytes, correspondant à la « sélection » d'un groupe d'ovocytes destinés à poursuivre leur croissance. Différents types de recrutement peuvent exister : un recrutement unique pour une saison à partir d'un groupe d'ovocytes à un stade de développement particulier ou des recrutements séquentiels à différents stades de développement (Wallace et Selman 1981). Les téléostéens représentent ainsi un groupe particulièrement intéressant pour l'étude des rythmes de formation, de recrutement et de croissance des ovocytes.

1.1 Caractéristiques générales du médaka, *Oryzias latipes*

Le médaka (*Oryzias latipes*), aussi appelé « ricefish », est originaire d'Asie et mesure entre 3 et 4 cm à l'âge adulte. La femelle produit des œufs qui sont fécondés et se développent de manière externe. Plusieurs caractéristiques rendent le médaka particulièrement intéressant en tant qu'animal modèle. Il est facile à élever, résistant à de grandes variations de température et de salinité de l'eau ainsi qu'à diverses pathologies (Wittbrodt, Shima, et Scharl 2002). Son génome est petit, comptant environ 800Mb, soit deux fois plus petit que le génome du poisson-zèbre (*Danio rerio*), et il est totalement séquencé depuis plusieurs années (Kasahara et al. 2007; Takeda 2008). Les techniques de transgénèse, de micro-injection dans l'œuf ou de transplantation sont également

applicables chez le médaka. De plus, son cycle de vie est relativement court et la ponte des femelles très régulière. Davantage de détails concernant ces deux caractéristiques sont citées ci-dessous.

1.1.1 Cycle de vie du médaka

Chez la femelle reproductivement active, les œufs pondus sont connectés par des filaments et restent positionnés au niveau de la papille génitale après la ponte jusqu'à ce qu'ils soient libérés ou déposés sur un substrat (après quelques heures). Les femelles reproductivement actives sont ainsi facilement identifiables. Les œufs fécondés et les embryons en cours de développement sont transparents, facilitant le suivi du développement et la caractérisation des stades embryonnaires. Le développement embryonnaire est relativement synchronisé au sein des individus provenant d'une même ponte et dure entre 7 et 9 jours jusqu'à éclosion. Une table de développement proposée par Iwamatsu (Takashi Iwamatsu 1988) peut être retrouvée en annexe (*Annexe 1, p.172*). Après fécondation, le temps de génération du médaka, en conditions de laboratoire, est de 6 à 8 semaines (2 à 3 mois) (Lawrence et al. 2012). Le médaka a une espérance de vie maximale estimée entre 1 an en conditions naturelles et 4 ans en conditions de laboratoire (Egami 1969). Un dimorphisme sexuel apparent existe chez les individus adultes avec des nageoires dorsales et anales plus longues chez les mâles ainsi qu'une séparation des derniers rayons de la nageoire dorsale. Contrairement au poisson-zèbre, le sexe génotypique est drivé par un gène particulier chez le médaka, *DMY/DMRT1bY*, et permet d'identifier une différenciation sexuelle avant l'apparition d'un dimorphisme sexuel (Matsuda et al. 2002). Il conserve, cependant, une certaine plasticité comme d'autres espèces de téléostéens et peut présenter des inversions de sexe phénotypique ou la formation d'ovotestis dans certaines conditions (M. Nakamura et al. 1998).

1.1.2 Cycle de reproduction du médaka

La fécondation est réalisée suite à la stimulation de la femelle par différentes approches du mâle comme la poursuite ou le frémissement de leur corps. Le cycle de reproduction du médaka est fortement synchronisé à la photopériode, permettant ainsi un contrôle de la production d'œufs en laboratoire. En milieu naturel, les femelles pondent chaque matin durant la saison de reproduction qui s'étend entre le mois d'Avril et Septembre, mais les pontes durant les derniers mois correspondent majoritairement à des femelles ayant eu une maturité retardée (Awaji et Hanyu 1987). En conditions de laboratoire, une photopériode courte est utilisée au cours des premiers mois de croissance après éclosion, puis une photopériode longue (14 h de jour/ 10h de nuit) stimule la production d'œufs, qui a généralement lieu 1 heure après l'allumage des lumières. Dans ces conditions, avec une eau autour de 26°C, les femelles produisent entre 20 et 40 œufs lorsque l'apport nutritif est suffisant, chaque jour (Briggs et Egami 1959). Ces cycles de reproduction journaliers peuvent être maintenus pendant plusieurs mois consécutifs et permettre la production de nombreux œufs de manière synchronisée pour la génération de nouvelles lignées ou des expérimentations en laboratoire. Le cycle de ponte du médaka étant ainsi très court (24 heures), et maintenu pendant une longue période (au moins 4 mois), cette espèce est aussi particulièrement intéressante pour étudier

les rythmes d'ovulation et les mécanismes de gestion de la réserve ovarienne pendant une période de reproduction active.

2. La fécondité peut fluctuer en fonction de nombreux paramètres

Chez les vertébrés, la fécondité est dépendante de multiples facteurs pouvant être endogènes ou exogènes. Chez les poissons téléostéens en particulier, le taux de fécondité peut fortement varier en fonction des paramètres environnementaux, comme par exemple la température de l'eau ou la durée de la photopériode. Chez le médaka, une réduction de la photopériode à 8h de jour (16h de nuit) provoque une sévère diminution de la production d'œufs alors qu'une baisse de la température à 15°C cause une réduction de la fécondité moins sévère, mais une augmentation de l'intervalle de ponte (Koger, Teh, et Hinton 1999). D'autres facteurs environnementaux, comme la pollution de l'eau, peuvent avoir un impact considérable sur la fécondité des poissons. De nombreuses études ont par exemple montré l'impact de produits interférant avec la fonction endocrine par une action mimant certains estrogènes (Arcand-Hoy et Benson 1998). Par ailleurs, la fécondité semble étroitement liée à la croissance des individus et influencée par le régime alimentaire (Volkoff 2016). Une récente étude a ainsi démontré qu'un meilleur taux de croissance, une meilleure survie et un taux de fécondité supérieur peuvent être atteints avec un régime alimentaire particulier chez le médaka, en comparaison à une nourriture commerciale (Russo et al. 2022).

La fluctuation du taux de fécondité entre différentes espèces ou individus reflète directement l'effet d'un paramètre donné sur le mécanisme à la base de la production des œufs : l'ovogenèse. De même, les variations de stratégies de reproduction entre espèces semblent directement liées à des mécanismes différents de régulation de l'ovogenèse, même si des principes clés sont conservés. Ainsi, pour mieux comprendre, évaluer et/ou contrôler la fécondité d'une espèce, il est impératif d'étudier les processus impliqués dans l'ovogenèse et sa régulation. Au cours de ces travaux de thèse, je me suis intéressée à différents processus de régulation de l'ovogenèse : la dynamique de recrutement et de croissance des ovocytes ainsi que la régulation de la fécondité par un micro-ARN. Deux questions principales ont été soulevées au cours de ces travaux :

Comment s'organisent les rythmes de croissance et les recrutements d'ovocytes au sein de la réserve ovarienne pour soutenir le rythme de ponte chez le médaka, et comment évolue-t-elle au cours du temps ?

Comment un micro-ARN, par sa fonction de régulation moléculaire, peut influencer l'ovogenèse au niveau cellulaire et macroscopique, et quelles fonctions peuvent être impliquées ?

Avant de présenter mes travaux et leur contribution à la production d'éléments de réponse à ces questions, j'ai choisi de présenter en introduction trois aspects de la fonction de reproduction chez la femelle et en particulier chez le médaka. Une première partie s'intéresse à l'aspect développemental de la gonade et des ovocytes. Une

seconde présente quelques notions concernant les vastes mécanismes de régulation de l'ovogenèse et l'intérêt croissant des micro-ARNs dans cette fonction. Dans une dernière partie, je décris l'aspect dynamique de l'ovogenèse à l'échelle de l'ovaire et l'importance de l'évolution des méthodes d'analyse dans ce domaine.

Partie I – Développement ovarien et ovogenèse

Lors de la formation d'un nouvel individu, les premières cellules totipotentes se divisent et se spécifient graduellement, entraînant la formation de feuillets embryonnaires à l'origine de différentes structures et donnant naissance aux organes spécialisés dans diverses fonctions chez l'animal adulte. Parmi ces cellules qui se spécialisent, la lignée cellulaire germinale constitue un groupe rare et particulièrement original, puisqu'elle constitue l'unité de transmission des informations entre individus. En effet, en s'associant avec d'autres cellules somatiques, les cellules germinales constituent les gonades au sein desquelles elles évolueront jusqu'à être capables de donner, après fécondation, un nouvel individu complet. Dans cette partie, je présente les données actuelles de la littérature permettant de comprendre les événements majeurs impliqués dans la formation de la lignée germinale et de la gonade primordiale, puis les mécanismes connus de l'ovogenèse permettant l'évolution vers une gonade fonctionnelle productrice de gamètes matures (ovocytes). Des éléments de régulation de ces étapes seront parfois abordés, mais d'autres mécanismes de régulation seront plutôt présentés en partie II d'introduction.

1. Développement de la gonade

1.1 Développement de la gonade primordiale

Le développement de la lignée germinale a été étudié extensivement au cours des 50 dernières années, chez des espèces de vertébrés (*Xenopus laevis*, *Mus musculus*) mais également d'invertébrés (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) (Saffman et Lasko 1999), et aussi chez les poissons (Braat, Speksnijder, et Zivkovic 1999). La formation des gonades a lieu de manière précoce chez de nombreux vertébrés sexués, et conservent globalement des étapes similaires bien que les mécanismes contrôlant ces étapes divergent (DeFalco et Capel 2009). Débutant dès l'embryogenèse, elle regroupe une étape de formation des précurseurs des cellules germinales et leur migration, puis leur organisation en une gonade primordiale par association avec d'autres cellules somatiques provenant d'autres précurseurs. Chez le médaka, ces mécanismes sont aujourd'hui relativement bien connus. Les éléments présentés ci-dessous concernent le médaka (récapitulés en **Figure 7**), sauf si précisé autrement.

1.1.1 *Origine et migration des cellules germinales*

Les cellules germinales se séparent des lignées somatiques très précocement au cours du développement embryonnaire. Appelées PGCs (Primordial Germ Cells) lorsqu'elles n'ont pas encore atteint la zone de la future gonade, elles possèdent des caractéristiques morphologiques distinguables comme une taille large, et un noyau proéminent (Gamo, H TI 1961; Shinomiya et al. 2000; Hamaguchi 1982) et peuvent être identifiées par différents déterminants tels que les protéines de liaison à l'ARN nanos et olvas (Shinomiya et al. 2000; S. Nakamura et al. 2010;

Hiromi Kurokawa et al. 2006). L'expression de *nanos3* est le marqueur qui a pu être détecté au plus tôt, dans des cellules dispersées autour du pôle animal dès la phase de gastrulation précoce (std 13) (Hiromi Kurokawa et al. 2006). L'expression d'*olvas* est nettement détectable dans les PGCs par hybridation in situ à partir de la gastrulation tardive (stade 17) au niveau de l'*embryonic shield* (Shinomiya et al. 2000).

La migration des PGCs jusqu'à la zone de la future gonade a été extensivement étudiée chez de nombreuses espèces et des voies de signalisation semblent conservées (Molyneaux et Wylie 2004). Chez le médaka, le développement de méthodes de transgénèse et d'imagerie in vivo ont permis de suivre ces cellules au cours du temps et ainsi de préciser les étapes de ce trajet durant le développement de l'embryon (**Figure 1**). A partir du pôle animal, elles migrent activement vers la zone marginale (stade 14-15) de façon dépendante de CXCR4 (chemokine récepteur). Au cours de la gastrulation tardive, les PGCs migrent vers les régions dorsolatérales du corps embryonnaire, de manière concomitante aux cellules somatiques, et s'alignent de manière bilatérale autour du mésoderme de la plaque latérale. Enfin, elles migrent activement vers la région postérieure du mésoderme, ventralement, vers le stade 23 notamment grâce à l'action chimiotactique médiée par SDF-1a/SDF1-b (Hiromi Kurokawa et al. 2006; Herpin et al. 2008). Les PGCs forment ensuite un seul cluster positionné dorso-latéralement à l'intestin (stade 30), sous les canaux néphrétiques, formant la zone gonadique avant de se rediviser en deux clusters bilatéraux (stade 33-35) (Tanaka et al. 2001).

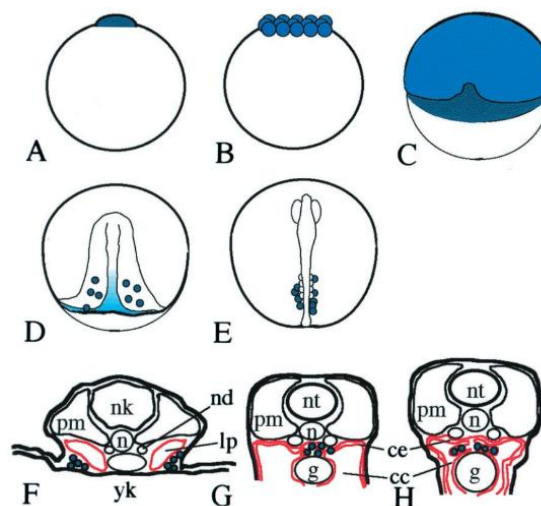


Figure 1 : Représentation schématique de la migration des cellules germinales dans les embryons de médaka.

Les cellules ou régions exprimant *olvas* sont colorées en bleu (le bleu foncé indique une expression plus intense). Le mésoderme de la plaque latérale et l'épithélium cœlomique sont représentés en rouge. (A) 1 cellule (stade 2) ; (B) morula (stade 8) ; (C) gastrulation précoce (stade 13) ; (D) gastrulation tardive (stade 16) ; (E) 4 somites (stade 20) ; (F) stade 25 ; (G) stade 35 (F-H, sections transversales). cc, cavité cœlomique ; ce, épithélium cœlomique ; g, intestin ; lp, mésoderme de la plaque latérale ; nd, conduit néphrétique ; n, notocorde ; nk, quille neurale ; nt, tube neural ; pm, mésoderme paraxial ; yk, vitellus. Extrait de (Tanaka et al. 2001).

1.1.2 *Division des cellules germinales*

Après l'étape de migration et colonisation de la gonade, les PGCs reprennent leur activité mitotique. Leur taux de prolifération varie en fonction du sexe et est largement plus prononcé chez les femelles génotypiques que les mâles, constituant le premier signe de différenciation sexuel visible chez le médaka. Plusieurs études s'entendent à dire que cette différence est nettement visible autour de l'éclosion (stade 39) (J. GERALD QUIRK et JAMES B. HAMILTON 1973; Hamaguchi 1982; Satoh et Egami 1972), bien que des quantifications plus récentes alternent entre un dimorphisme au stade 37 (Saito et al. 2007) ou 38 (T. Kobayashi et al. 2004). Le nombre supérieur de cellules germinales chez les femelles atteint au stade 39 semble coïncider avec une croissance exponentielle de ces cellules, alors qu'elle reste plutôt linéaire chez les mâles. Cette prolifération différentielle en fonction du sexe semble être un mécanisme relativement conservé chez les vertébrés (Brennan et Capel 2004).

Chez le médaka, cette augmentation a été associée à l'existence de deux types de prolifération identifiés par Saito et al (Saito et al. 2007). Le type I se divise de manière intermittente pour produire des progéniteurs isolés les uns des autres. Ce type de division est présent à la fois chez les mâles et les femelles. En revanche, un deuxième type de division existe chez les femelles dès le stade 36, plus rapide et continu (deux à trois cycles de division), conduisant à la formation de clusters où les cellules germinales restent en contact. Le type I de division se rapproche ainsi d'un type « cellules souches », produisant des cellules fille morphologiquement identiques et d'autres qui, de manière synchronisée, se multiplient sous forme de cystes syncytiaux (type II « cyste ») puis entrent en méiose (**Figure 2**). L'étude du mutant *zenzai* a en effet montré les cellules germinales contenues dans ces cystes sont celles dédiées à la formation des ovocytes et sont essentielles au bon déroulement de la gamétogenèse (Saito et al. 2007). La présence de cellules méiotiques dès l'éclosion constitue ainsi également une différence sexuelle observable chez les femelles, de manière cohérente avec des précédentes observations (Satoh et Egami 1972). Les caractéristiques associées à des cellules souches, suggérées pour les cellules se divisant selon le type I, ont été confirmées quelques années plus tard par la mise en évidence de leur capacité à s'auto-renouveler mais également à rétablir des populations de cellules type « cystes » et des cellules germinales méiotiques après un traitement au busulfan (S. Nakamura et al. 2010).

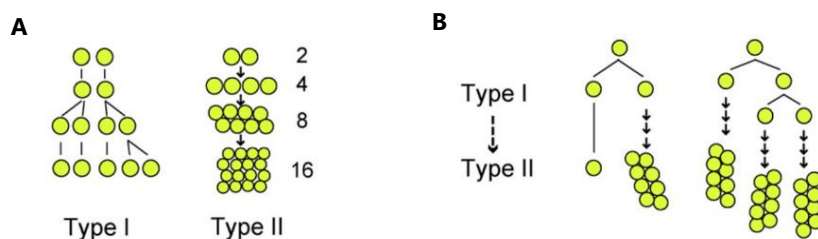


Figure 2 : Deux types de prolifération des cellules germinales se produisent pendant la différenciation sexuelle chez le médaka. (A) Schémas de division des cellules germinales dans l'embryon, de type I (à gauche) dans une gonade XY ou de type II (à droite) dans une gonade XX. (B) Transition schématique de la prolifération de type I à celle de type II dans une gonade XX. Les cellules germinales peuvent donner naissance à des cellules isolées puis certaines cellules germinales subir quatre divisions synchrones donnant naissance à un groupe d'environ 16 petites cellules germinales. Extrait de (Saito et al. 2007).

1.1.3 *Précurseurs des cellules somatiques gonadiques*

La formation des gonades ne dépend pas uniquement du bon développement des cellules germinales, mais aussi de l'association et la spécialisation de cellules somatiques supportrices, notamment pour la formation des follicules dans l'ovaire. Au stade 23, lorsque les PGCs migrent activement vers la région postérieure du mésoderme de la plaque latérale, deux populations distinctes de cellules somatiques ont été distinguées au sein de la région exprimant *sdf1-a*. La sous-population plus postérieure exprime *ftz-f1*, alors que la plus antérieure exprime *sox9b*, un gène identifié comme essentiel pour la différenciation testiculaire chez les mammifères. Au stade 30, alors que les PGCs migrent vers la région dorsale de l'intestin postérieur, les cellules exprimant *ftz-f1* sont retrouvées adjacentes aux PGCs, alors que les cellules exprimant *sox9b* sont localisées dans la partie médiane du mésoderme de la plaque latérale, sous les canaux néphrétiques. Ces deux sous-populations se rencontrent ensuite dans la zone de la gonade primordiale au stade 33 et forment ainsi les gonades indifférenciées communes aux deux sexes (**Figure 3**) (Shuhei Nakamura et al. 2006; Nishimura et Tanaka 2014). La co-expression de *sox9b* et des marqueurs respectifs des cellules de Sertoli chez le mâle (Kondo et al. 2009; Nanda et al. 2002) et des cellules de la granulosa chez la femelle (Nakamoto et al. 2006) a été observée au cours de la différenciation morphologique des gonades. Ceci suggère que les cellules *sox9b* représentent des précurseurs des cellules supportrices chez les deux sexes (Shuhei Nakamura et al. 2008).

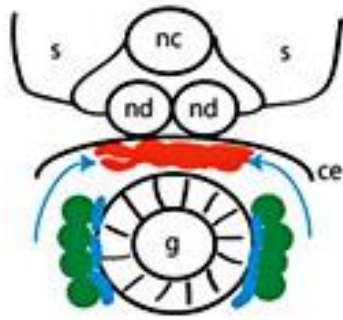


Figure 3: Représentation schématique de 2 précurseurs somatiques gonadiques distincts dans les embryons de médaka. Coupe transversale d'un embryon au stade 30. Les cellules exprimant *ftz-f1* (bleu) et les cellules germinales (vert) se déplacent vers la région gonadique potentielle, où la gonade primordiale est formée avec les cellules exprimant *sox9b* (rouge). A = antérieur ; ce = épithélium coelomique ; D = dorsal ; nc = notochorde ; P = postérieur ; s = somite ; V = ventral ; y = sac vitellin. canal néphrétique (nd), pronéphros (pn). Extrait de (Nishimura et Tanaka 2014).

1.2 Organisation structurelle de l'ovaire et formation des follicules

Comme nous l'avons vu, l'association des cellules germinales et des précurseurs des cellules somatiques (*sox9b*) supportrices aboutit à la formation d'une gonade bipotentielle indifférenciée. Plusieurs mécanismes sont alors impliqués lors de la différenciation gonadique afin de former les follicules et d'évoluer en gonades fonctionnelles. Ils impliquent notamment une réorganisation morphologique et une spécification des cellules somatiques supportrices.

1.2.1 *D'une structure commune à une morphologie différenciée*

Dans la gonade primordiale, un premier signe de dimorphisme est le nombre supérieur de cellules germinales chez la femelle aux stades proches de l'éclosion, comme nous l'avons vu précédemment. Cependant, les structures sont alors encore largement indifférenciées, essentiellement composées de cellules germinales entourées de cellules exprimant *sox9b*. A éclosion, la structure commune embryonnaire commence à établir une membrane basale, au niveau de la partie ventrale de la gonade. Il est suggéré que cette membrane basale enrichie en laminine se forme via le dépôt de laminine dans les cellules *sox9b* (Nishimura, Nakamura, et Tanaka 2016). La formation de cette membrane basale participe alors à la création d'une structure particulière nommée épithélium germinale. Comme tous les épithéliums, il possède des cellules épithéliales jointives, supportées par une membrane basale, est avasculaire et borde une surface, un conduit ou lumen. L'épithélium germinale, cependant, se compose de cellules somatiques et de cellules germinales (Grier, Harry J. 2002). La morphologie et la fonction de cette structure semble grandement conservée parmi les téléostéens et son niveau d'activité liée aux différents modes de reproduction (déterminé, indéterminé) (Grier et al. 2016; Wallace et Selman 1990).

Chez le médaka, il semble que cet épithélium germinale puisse donner lieu à la formation de follicules et de spermatogonies. En effet, chez la lignée mutante *foxl3* (exprimé dans les cellules germinales et réprimant la spermatogenèse chez les femelles), les femelles développent un ovaire relativement normal, capable de donner des follicules matures et fécondables (**Figure 4**). En revanche, tous les stades de la spermatogenèse sont également retrouvés au sein de l'épithélium germinale, plus largement étendu que dans l'ovaire de femelles sauvages (Nishimura et al. 2015; Nishimura, Nakamura, et Tanaka 2016). De plus, il est suggéré que les cellules *sox9b* conservent une fonction commune de maintenance des cellules germinales souches pendant la gamétogenèse précoce, puisqu'une perte graduelle de cellules germinales a pu être observée chez des mutants du gène *sox9b* (Shuhei Nakamura et al. 2012).

A partir de cette unité commune représentée par l'épithélium germinale, la féminisation de la gonade chez le médaka semble largement dépendante de la présence des cellules germinales (H. Kurokawa et al. 2007), ainsi que de l'expression de certains gènes somatiques ou germinaux notamment liés à la production d'œstrogènes (Guiguen et al. 2010; M. Li, Sun, et Wang 2019). Je ne détaillerai pas ici les nombreux mécanismes moléculaires associés à la détermination sexuelle, mais quelques exemples clés seront abordés concernant la différenciation des cellules somatiques et leur fonctionnalisation dans l'ovaire dans le paragraphe suivant. Cependant, notons que deux événements morphologiques majeurs ont été observés au cours de la féminisation des gonades : la formation des follicules après sortie de l'épithélium germinale (autour de 10 jours post-éclosion, (Shinomiya, Hamaguchi, et Shibata 2001; Shuhei Nakamura et al. 2008)) et la création de la cavité ovarienne (vers 30 jours post-éclosion), où seront expulsés les ovocytes à l'ovulation (T. Kobayashi et al. 2004). La formation de la cavité ovarienne est notamment dépendante des œstrogènes, produits via la fonction de l'*aromatase* (*Cyp19*) (Suzuki, Tanaka, et Shibata 2004).

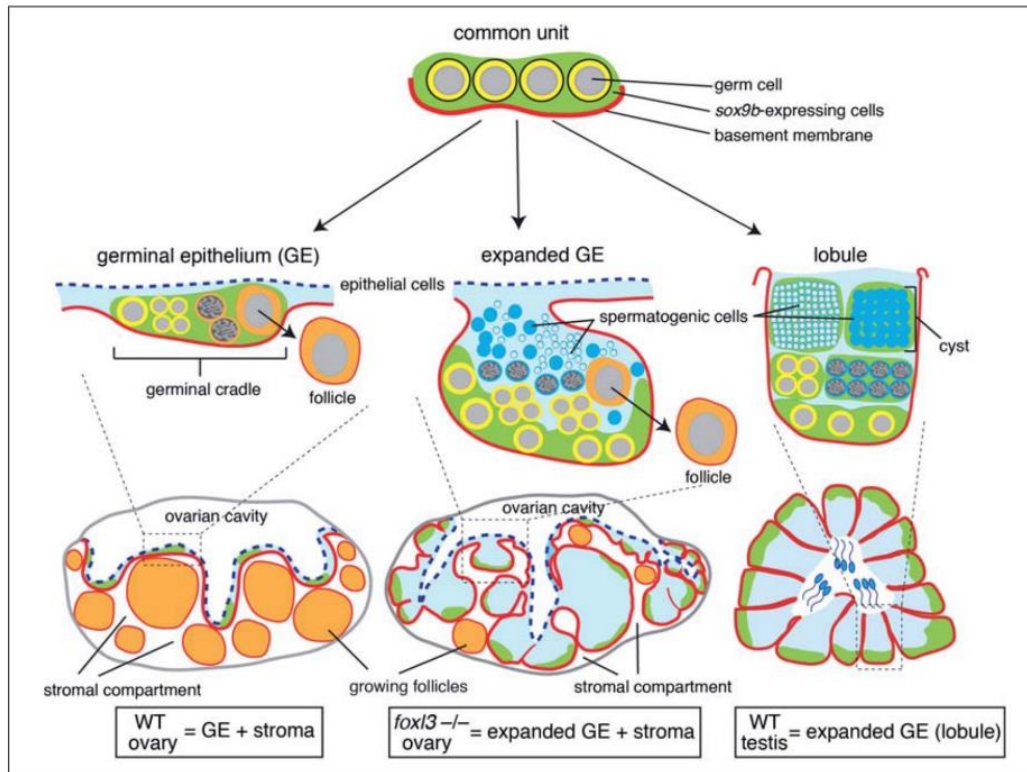


Figure 4: L'unité commune aux testicules et aux ovaires maintient les cellules souches germinales chez le médaka. Les cellules germinales associées à des cellules exprimant *sox9b* (vert) sous une membrane basale (ligne rouge) sont des unités structurales et fonctionnelles communes. Au cours du développement ovarien, elle se différencie en épithélium germinale (GE) où les cellules germinales, entourées de cellules *sox9b*, forment des niches germinales. Les ovocytes diplotènes qui y sont formés sortent ensuite dans le compartiment stromal développé où ont lieu la formation et la croissance des follicules (à gauche). Dans l'ovaire du mutant *foxl3* (*foxl3*^{-/-}), une spermatogénèse continue se produit à l'intérieur d'un GE élargi (au centre). Dans les testicules de type sauvage, l'unité des cellules germinales et des cellules exprimant *sox9b* s'étend et développe des lobules (à droite). Par conséquent, le testicule peut être considéré comme une version étendue du GE où la spermatogénèse se produit de manière organisée. Notez que l'arrangement de la spermatogénèse est désorganisé dans l'ovaire *foxl3*^{-/-}. Extrait de (Nishimura, Nakamura, et Tanaka 2016).

1.2.2 *Emergence des follicules à partir des cordons germinatifs*

Chez le médaka, une organisation particulière a été décrite au sein de l'épithélium germinatif de l'ovaire, où a lieu les premières étapes de l'ovogenèse. Des clusters en forme de filaments, appelés cordons germinatifs ou « germinal cradles », regroupent différents types de cellules germinales en cours de division, que nous avons cités auparavant, entourés de cellules somatiques exprimant *sox9b* (Figure 5). Ainsi, les germinal cradles sont composés de cellules germinales souches isolées exprimant *nanos-2*, de cellules formant des cystes en cours de mitoses ou de méiose jusqu'au stade pachytène et enfin des ovogonies isolées au stade diplotène. Ces ovocytes au stade diplotène de prophase I resteront bloqués jusqu'à reprise de méiose à des stades plus tardifs de l'ovogenèse. Ils s'individualisent au sein des cordons germinatifs, et peuvent migrer activement vers d'autres cordons (S. Nakamura et al. 2010; Shuhei Nakamura et al. 2011). C'est en quittant l'épithélium germinatif pour le compartiment stromal que les ovocytes au stade diplotène se développent en follicules. Ce mécanisme de formation de follicules *de novo*, à la base de la création des premiers follicules au cours du développement larvaire, est également observé dans l'ovaire adulte, soutenant l'idée d'un renouvellement actif des follicules au cours de la vie chez le médaka, à l'inverse de la majorité des mammifères (S. Nakamura et al. 2010; Nicol et al. 2022).

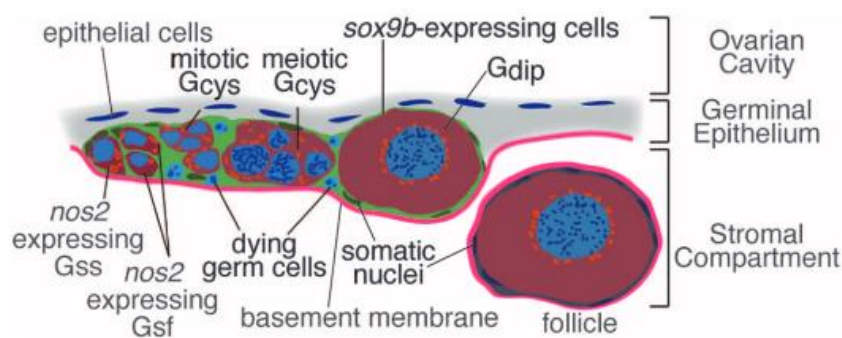


Figure 5: Représentation schématique du développement des cellules germinales dans le germinal cradle. Les cellules germinales sont imbriquées dans des niches dans un cordon ovarien entrelacé de cellules exprimant *sox9b* (vert) dans l'épithélium germinatif. Des cellules Gs isolées exprimant *nos2* (soit des cellules Gss ou Gsf), des cellules Gcys et des ovocytes Gdip sont présents dans le berceau germinatif. Après plusieurs divisions mitotiques synchrones (Gcys mitotiques), les cellules Gcys entrent en méiose (Gcys méiotiques). Alors que certaines cellules formant des kystes meurent et sont éliminées, d'autres se développent en ovocytes Gdip et quittent les berceaux germinatifs sous forme de follicules pour un développement ultérieur des ovocytes. Une population de cellules Gs maintient les populations d'ovocytes Gcys et Gdip, permettant la production d'un grand nombre d'ovules fertiles. Extrait de (S. Nakamura et al. 2010).

1.3 Recrutement des cellules folliculaires

Bien que l'organisation et la temporalité précise de ce passage vers le compartiment stromal ne soient pas encore complètement compris, certains mécanismes liés à la formation des follicules ont été décrits chez le médaka, notamment la différenciation et le recrutement des cellules somatiques supportrices. Comme nous l'avons mentionné précédemment, *foxl2*, un facteur de transcription membre de la famille « winged helix/forkhead », est exprimé fortement dans les cellules supportrices de la granulosa formant les follicules chez la femelle adulte, à l'exception des follicules en cours de maturation finale. Par des expériences d'hybridation *in situ*, son induction a été détectée dans les cellules somatiques entre 0 et 5 jours post-éclosion. Il est également co-exprimé avec l'*aromatase* dans certaines cellules dans la partie ventrale de l'ovaire à 10 jours post-éclosion, suggérant un rôle de *foxl2* dans la régulation de la stéroïdogénèse (Nakamoto et al. 2006). De plus, il serait exprimé d'abord dans les cellules germinales du cradle, entourées de cellules *sox9b*, puis plutôt dans les cellules somatiques à mesure qu'elles perdent l'expression de *sox9b*. Ceci serait en faveur d'une induction de *foxl2* dans les cellules de la granulosa lors de la sortie du germinal cradle (Nakamoto et al. 2006; Herpin et al. 2013). Cependant, le mécanisme clair enclenchant la sortie du cradle et le début de croissance folliculaire et sa temporalité reste mal connus.

Lors de la formation du follicule, un second type de cellules supportrices est recruté, à partir des cellules somatiques du compartiment stromal. Ces cellules, nommées cellules de la thèque, forment une seconde couche externe autour du follicule. Elles restent assez mal caractérisées chez les téléostéens, avec pour cause, une complexité émergeant de l'existence de différents types de cellules thécales et de cellules réalisant la stéroïdogénèse (**Figure 6**). Les cellules de la thèque ont été initialement identifiées via l'expression de P450c17-1 (*cyp17a1*, *cytochrome P450 hydroxylase and c17 lyase*) lié à la production d'androgènes (D. Kobayashi et al. 1996; H. Kurokawa et al. 2007). L'analyse de l'expression d'une lignée transgénique rapporteur pour l'aromatase a montré qu'au moins un autre type de cellules exprimant l'aromatase (*cyp19a1a*) peuvent être distinguées par l'expression ou non de *foxl2* et de *cyp17a1* (Shuhei Nakamura et al. 2009; Herpin et al. 2013).

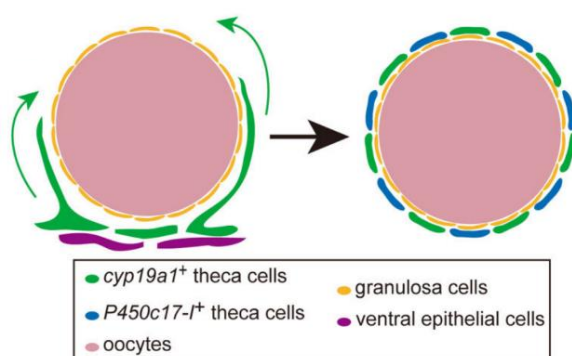


Figure 6: Processus de développement possible des lignées de cellules thécales dans la gonade femelle en développement. Les cellules thécales exprimant *Cyp19a1* (en vert) sont originaires de la région stromale de la gonade, près de l'épithélium ventral (en violet). Lorsque les follicules se développent, certaines populations étendent leurs processus cellulaires vers la couche externe des follicules (à gauche). Les cellules de la thèque exprimant *cyp19a1* et celles exprimant *P450c17-1* (bleu) s'alignent sur la couche externe du follicule (droite). Extrait de (Shuhei Nakamura et al. 2009).

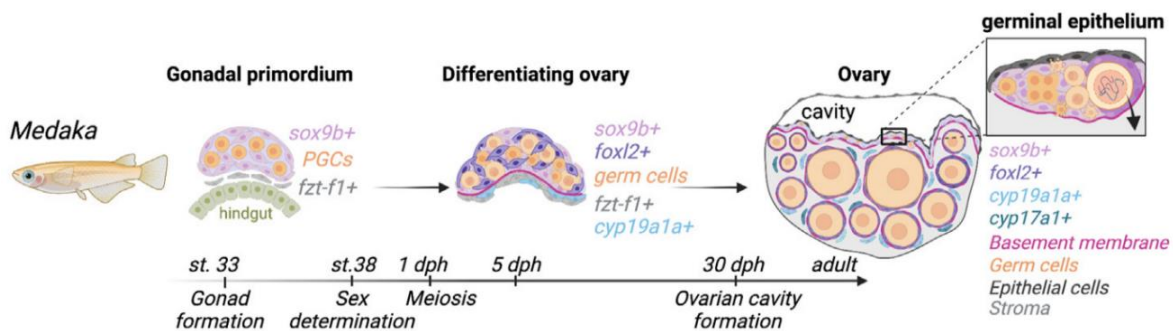


Figure 7 : Morphogénèse ovarienne chez le médaka. Le primordium gonadique est composé de trois populations cellulaires : les cellules germinales primordiales (PGC), les cellules *fzt-f1+* et les précurseurs de cellules de soutien *sox9b+*. La détermination du sexe est initiée juste avant l'éclosion, au stade 38. Les cellules *sox9b+* entourent les PGC pour donner naissance aux niches germinales qui formeront plus tard un épithélium germinale multicouche avec des cellules épithéliales. À l'éclosion, une membrane basale est formée sur le côté ventral. La méiose est initiée 1 jour après l'éclosion (dph), et *foxl2* s'exprime dans les cellules de soutien entourant les ovocytes diplotènes qui sortent des niches. Vers 5 dph, *cyp19a1+* s'exprime dans les cellules du stroma dans la région ventrale. Au fur et à mesure que les follicules se développent dans le stroma, les cellules de la granulosa *foxl2+* recrutent des cellules *cyp19a1a+* et des cellules de la thèque *cyp17a1+*. La cavité ovarienne se forme vers 30 dph. Les ovaires adultes contiennent encore un épithélium germinale (encart) composé de cellules de soutien *sox9+* indifférenciées et de cellules souches germinales qui se divisent de manière synchrone, entrent en méiose et meurent ou sortent du berceau pour former des follicules dans le stroma. Extrait de (Nicol et al. 2022).

2. Les stades de l'ovogénèse

L'acquisition des capacités reproductrices correspond à la capacité de produire un ovocyte fonctionnel (*i.e* prêt à être fécondé). Suite à la formation de la gonade, la production de ces œufs dépendra du bon déroulement de la croissance des follicules dans l'ovaire. Chez les téléostéens, la croissance des follicules a été largement étudiée en termes de changements morphologiques, biochimiques et de physiologiques, notamment via l'étude de leur capacité à produire des stéroïdes, en réponse ou non à des stimuli gonadotropiques (Tenugu et al. 2021). Parmi de nombreuses espèces, différentes phases semblent conservées au cours de l'ovogénèse, bien que leur durée et type

de classification puissent diverger. Deux phases de croissance sont généralement décrites, où l'ovocyte subira une augmentation importante de leur volume ainsi que des modifications majeures au sein des follicules. Ces phases de croissances sont communément appelées pré-vitellogenèse (ou croissance primaire) et vitellogenèse (ou croissance secondaire). Pendant ces périodes de croissance, il peut également être distingué une partie dépendante des gonadotropines et non-dépendante, comme décrites chez les mammifères. La dernière phase de maturation, elle, correspond essentiellement à la préparation des ovocytes à l'ovulation. Comme cité précédemment, chez le médaka adulte, le développement asynchrone des ovocytes rend observables toutes les phases de développement des follicules dans l'ovaire.

La différenciation de chaque état de développement des ovocytes est une tâche complexe, puisque le phénomène est bien entendu continu et il est parfois difficile d'attribuer une limite entre deux états. De nombreuses études se sont pourtant attachées à classifier les ovocytes en fonction de leur stade de développement, facilitant ainsi l'analyse d'évènements majeurs se déroulant à un stade donné. Chez le médaka, plusieurs auteurs se sont intéressés à la classification des stades de l'ovogenèse (pour comparaison, voir Takashi Iwamatsu 1988). Parmi eux, Iwamatsu construit une table de développement des ovocytes par des critères observés via microscopie en lumière blanche, microscopie électronique, mais aussi l'observation des différents contenus protéiques et des capacités de production de stéroïdes. Cette table s'ajoute à d'autres études de développement ovocytaires réalisés chez d'autres espèces (Sumpter, J. P. et al. 1984; Bromage et Cumaranatunga 1988; Tyler et Sumpter 1996) mais combinant cette fois des différents critères morphologiques, biochimiques et physiologiques qui était auparavant étudiés séparément. En ce sens, elle constitue aujourd'hui la description la plus complète des caractéristiques des follicules à différents stades de croissance. Selon cette classification, l'ovogenèse est divisée au sens large en cinq phases qui correspondent, plus précisément, à dix stades de développement des ovocytes (Takashi Iwamatsu 1988) (*Annexe 2, p.180*).

Dans cette partie, je décrirai les caractéristiques majeures décrites par Iwamatsu à chaque stade de l'ovogenèse selon sa classification, et compléterai la compréhension de certains mécanismes par des observations relevées dans d'autres études.

2.1 Pré-vitellogenèse

La phase de croissance primaire a été divisée en une période précoce et tardives, elles-mêmes subdivisées en deux stades d'ovogenèse. On retrouve, dans la période de pré-vitellogenèse précoce, les stades I et II de l'ovogenèse, décrits comme stade « chromatin-nucleolar » et « perinucleolar », respectivement. Puis, en pré-vitellogenèse tardive (« chorion-formation »), le stade III « chorion-rudiment » et IV « attaching filament and oil-droplet formation » sont distingués (Takashi Iwamatsu 1988). Une représentation schématique de ces stades et leurs caractéristiques morphologiques sont retrouvées en **Figure 8**.

2.1.1 *Les stades de la pré-vitellogenèse chez le médaka*

Le stade I comprend des follicules mesurant entre 20 et 60 µm de diamètre, un noyau arborant de nombreux nucléoles sphériques et une chromatine filamenteuse organisée en réseau. Les organelles (mitochondries, réticulum endoplasmique tubulaire) sont peu développées, et une unique couche de minces cellules folliculaires recouvre les ovocytes. Au stade II (follicules entre 60-90 µm), les ovocytes ont développé un noyau large et les nucléoles sont arrangés en périphérie. Une structure particulière, le noyau vitellin (« yolk nucleus » ou « Balbiani's body ») est facilement détectable dans le cytoplasme. Les cellules de la granulosa sont peu développées et de minces cellules de la thèque y sont apposées, séparées par une membrane basale. Le stade III (follicules entre 90-120 µm) présente un début de formation du chorion, avec des villosités en cours de formation. La couche de cellules de la granulosa apparaît fermement connectée avec de nombreux desmosomes. Les follicules au stade IV, mesurant entre 120 et 150 µm de diamètre, ont largement développé leurs réticulum, complexes de Golgi et mitochondries. Le noyau vitellin est également plus large à ce stade, et des chromosomes de type « lamp-brush » sont visibles. Les villosités du chorion se différencient au pôle végétal, formant les filaments d'attache, et les cellules de la granulosa sont plus épaisses sur ce pôle.

2.1.2 *Mécanismes majeurs mis en place et régulation de la croissance primaire*

Les descriptions de ces quatre stades, combinées, rendent compte d'une activité de formation intense d'organelles et d'ARNs (Wallace et Selman 1990), ainsi que de l'induction d'une polarité ovocytaire remarquée par la différenciation des filaments au pôle végétal. La formation de nombreux nucléoles facilite notamment l'accumulation intense d'ARNs (del Pino et al. 1986; Van Gansen et Schram 1972). L'agrégat d'organelles constitué par le noyau vitellin est une structure grandement conservée parmi les vertébrés (décrite par (Guraya 1979)), et serait associée à la polarisation des ovocytes et la localisation du « nuage » ou « germ plasm », caractéristique des cellules germinales chez de nombreuses espèces (Braat, Speksnijder, et Zivkovic 1999; Elkouby 2017; Elkouby et Mullins 2017; Jamieson-Lucy et Mullins 2019).

Chez plusieurs espèces de téléostéens, y compris le médaka, cette phase de croissance primaire ne semble pas être dépendante de la stimulation par les gonadotropines, produites par l'hypophyse et connues notamment pour réguler la stéroïdogenèse (Lubzens et al. 2010). Ceci a été montré dans des études réalisant des hypophysectomies où les ovaires développaient normalement des follicules pré-vitellins, et peuvent répondre à une stimulation par l'estradiol, comme aussi observé dans des cultures isolées de follicules (Khoo 1979; T. Iwamatsu et al. 1987). D'autres expériences en culture *in vitro* ont montré une augmentation de la taille des follicules pré-vitellins sous l'action de la 11-KT et d'IGF-1 mais pas d'E2 ni de la FSH seule (Lokman et al. 2007). Cette conception est toutefois peut-être contestable, car n'identifie pas si la croissance primaire est retardée ou si un nombre inférieur de follicules est formé à l'échelle de l'ovaire. Une étude plus récente chez le médaka a d'ailleurs décrit un retard de développement des follicules chez une lignée déficiente en FSH, après invalidation du gène codant pour sa sous-unité beta, mais

2.2 Vitellogenèse

Comme pour la phase de croissance primaire, Iwamatsu subdivise la phase de croissance secondaire (ou vitellogenèse) en deux temps (précoce « pre-yolk formation », et tardive « yolk-formation »), elles-mêmes divisées en deux stades. Se succèdent ainsi le stade V « early yolk vesicle », le stade VI « late yolk vesicle », puis le stade VII « early yolk formation » et enfin le stade VIII « late yolk formation » (Takashi Iwamatsu 1988).

2.2.1 *Les stades de la vitellogenèse chez le médaka*

Les follicules au stade V mesurent entre 150 et 400 μm de diamètres et contiennent des petites vésicules vitellines (aussi appelées « cortical alveoli ») alors que le noyau vitellin n'est plus observable dans le cytoplasme. Le chorion a développé une seconde couche interne couvrant la surface de l'ovocyte et une cellule spécialisée est vaguement observable parmi les cellules de la granulosa, assimilée à la cellule micropylaire. Au stade VI (follicules de 250-400 μm), De larges vésicules vitellines occupent la majeure partie du cytoplasme et le contenu protéique se diversifie (majoritairement de faible poids moléculaire). Les cellules de la granulosa ont des organelles développées, sont en contact avec l'ovocyte via des gap junctions. Ces follicules sont les premiers où une activité de production de 17β -œstradiol est détectée. Toutefois, cette sécrétion n'est pas stimulée par les gonadotropines *in vitro*. Les follicules de stade VII (400-500 μm) augmentent rapidement de volume avec un élargissement des vésicules vitellines qui occupent tout le cytoplasme. Le micropyle est aisément observable, et le noyau ovocytaire (ou vésicule germinale) migre vers le pôle animal où le chorion apparaît plus épais. Les protéines du vitellus, de plus fort poids moléculaire, apparaissent. La production de 17β -œstradiol a fortement augmenté à ce stade et est stimulée par les gonadotropines, alors que la production de 17α , 20β -diOHprog devient légèrement détectable mais non influencée par les gonadotropines. Enfin, au stade VIII comprenant des follicules mesurant entre 500 et 800 μm , une large masse vitelline a été formée et la polarité de l'œuf est bien déterminée morphologiquement. La production de 17β -œstradiol et 17α , 20β -diOHprog est stimulée par les gonadotropines. Au cours de ces deux derniers stades, des globules lipidiques apparaissent également.

2.2.2 *Quelques caractéristiques de la croissance secondaire*

La croissance secondaire, communément appelée vitellogenèse, regroupe ainsi différents mécanismes aboutissant à un large accroissement du volume folliculaire et l'acquisition de leurs capacités de stéroïdogénèse via le développement des cellules somatiques. Elle se caractérise notamment par l'accumulation impressionnante de lipides et phospholipides ainsi que de protéines et vitamines (Lubzens et al. 2010). Les vitellogenines, des phospholipoglycoprotéines, sont notamment à l'origine d'une partie des lipides et des protéines après endocytose, via des récepteurs spécifiques Lr8 et/ou Lrp13, puis clivage par des enzymes comme les cathepsines D au sein des lysosomes (Reading et al. 2018; Patiño et Sullivan 2002). L'internalisation de composants variés est dépendante de nombreux mécanismes de transport à travers la couche de granulosa, mais aussi de signaux endocrines. En effet,

l'augmentation progressive des niveaux d'œstrogènes synthétisés par les cellules somatiques coïncide avec l'accroissement de la masse vitelline. De nombreuses études ont montré que les œstrogènes stimulent la synthèse de vitellogenines par les hépatocytes, qui migrent ensuite vers l'ovaire via la circulation sanguine (voir revue par (Babin et al. 2007)). Ces mécanismes rendent également compte de l'importance d'une régulation hormonale complexe mettant en jeu les hormones pituitaires, elles-mêmes sécrétées en réponse à la GnRH produite par l'hypothalamus (Kagawa 2013), et distinguant ainsi la phase de croissance non-dépendante des hormones et la croissance secondaire largement dépendante de ces signaux endocrines/paracrines. L'expression de nombreux gènes sont associés à cette régulation, qu'ils concernent la formation des récepteurs aux œstrogènes, la stéroïdogénèse (*StAR*, *3βHSD*, *P450c17*) ou des voies de signalisation impliquant des facteurs de croissance (familles IGF, TGF) (Shibata et al. 2011; Lubzens et al. 2010; Reading et al. 2018; Tyler et Sumpter 1996). Des exemples détaillant d'avantage le rôle des gonadotropines et hormones stéroïdiennes seront présentés en partie II de cette introduction.

2.3 Post-vitellogenèse

La post-vitellogenèse comprend des follicules pré-ovulatoire développés. Deux étapes sont décrites par Iwamatsu : un stade IX de « maturation » et le stade X « postovulatory ».

2.3.1 *Les stades de la post-vitellogenèse chez le médaka*

Les follicules au stade IX mesurant entre 800 et 1200 µm de diamètre sont retrouvés dans l'ovaire dans les 24h avant l'ovulation. Ils sont caractérisés par un évènement, le GVBD (germinal vesicle breakdown) entraînant la reprise de la métaphase II de méiose et l'expulsion du globule polaire au pôle animal. Des structures particulières, « annulate lamellae » sont observables dans le cytoplasme et les vésicules vitellines et gouttelettes lipidiques sont clairement visible dans le cytoplasme peu épais en périphérie de la masse vitelline. La maturation de ces follicules prend place sous la stimulation de MIS (maturation inducing steroids), et les follicules produisent de l'E2 et la 17α, 20β-diOHprog. Une forte augmentation du volume ovocytaire a lieu lors du processus d'hydratation précédant l'ovulation. L'ovulation a ensuite lieu à partir du pôle végétal, libérant l'ovocyte des couches folliculaires vers la cavité ovarienne. Après ovulation, au stade X, les ovocytes ou œufs présentent de courtes villosités et des filaments d'attachements sur leur chorion. La relative transparence des œufs laisse apparaître les alvéoles corticales et des gouttelettes lipidiques à la surface (Takashi Iwamatsu 1988).

2.3.2 *Facteurs impliqués dans la maturation finale*

Bien qu'il ne soit pas mis fortement en évidence dans la table d'Iwamatsu, un shift de stéroïdes majeur a été décrit dans de nombreuses études lors du passage à la phase de maturation des ovocytes. La période de

vitellogenèse est principalement marquée par la production d'E2, alors que la phase de maturation se distingue par une production plus forte de $17\alpha, 20\beta$ -DP. Ce stéroïde a ainsi été identifié comme un facteur majeur de l'induction de la maturation (MIH, maturation-inducing hormone) (D. Kobayashi et al. 1996; Nagahama 1994). Ce shift est notamment associé à un changement d'enrichissement en certaines enzymes de la stéroïdogénèse, et une modification des précurseurs stéroïdiens synthétisés. L'augmentation de la production de MIH est corrélée à une diminution des niveaux de P450c17 (P450c17-I) et P450 aromatasase, alors que les niveaux d'une seconde forme de P450c17 (P450c17-II) et de la *20 β -hydroxysteroid dehydrogenase (20 β -HSD)* augmentent (Nagahama et Yamashita 2008). La production de MIH entraîne ensuite la synthèse d'un deuxième facteur, MPF (maturation-promoting factor) qui induit la GVBD. Le MPF, par sa conservation structurelle et sa capacité à induire la maturation d'ovocytes indépendamment de son espèce d'origine, est aujourd'hui plus connu comme un promoteur de la phase M du cycle cellulaire, où a lieu une condensation des chromosomes et la rupture de l'enveloppe nucléaire, événements retrouvés dans la GVBD (Nagahama et Yamashita 2008).

D'autres classifications des stades de l'ovogenèse distinguent plus généralement quatre étapes de développement des follicules chez les téléostéens : la croissance primaire, le stade d'alvéoles corticales ou vésicules vitellines, la vitellogenèse et la maturation (Wallace et Selman 1981; West 1990; Tyler et Sumpter 1996; Bromage et Cumaranatunga 1988). Chez Iwamatsu, la phase de vitellogenèse ne décrit pas uniquement l'étape d'incorporation des vitellogenines mais comprend également les stades folliculaires où s'accumulent les alvéoles corticales. L'association de différentes méthodes d'analyse, combinant des observations ultra structurales, fonctionnelles et morphométriques, rend cette classification particulièrement utile pour la description du contenu ovarien dans d'autres études chez le médaka comme il a été le cas dans de nombreuses études.

Partie II : Régulation de l'ovogenèse au cours du cycle de vie

L'ovogenèse est un processus finement régulé par de nombreux acteurs, pouvant jouer un rôle à différents temps du développement ou de la période de reproduction active des femelles. Sa régulation par la synthèse des hormones stéroïdiennes a été particulièrement étudiée chez les téléostéens. Depuis quelques dizaines d'années, le rôle d'autres acteurs tels que des facteurs de transcription, des facteurs de croissances ou d'autres gènes codants est mieux documenté chez les poissons. Les études ont notamment profité des nouvelles méthodes d'édition du génome, révélant des mécanismes clés impliqués dans la formation des gonades ou le contrôle de la croissance folliculaire. De nouveaux acteurs ont également suscité un intérêt croissant, incluant divers types d'ARNs non codants pour des protéines (miRNA, lcrRNA, piRNA). Au cours de mes travaux de thèse, je me suis intéressée au rôle des micro-ARNs dans la régulation de l'ovogenèse et plus particulièrement au rôle d'un micro-ARN prédominant dans l'ovaire. Dans cette partie, je rappellerai quelques exemples de régulateurs majeurs de l'ovogenèse à différentes étapes de développement des ovocytes/follicules, en relevant particulièrement les données recueillies par des méthodes d'inactivation de gènes produites ces dernières années. Une seconde partie introduira les diverses évidences de l'importance des micro-ARNs dans la régulation de l'ovogenèse et les relatives difficultés pour élucider leur mécanisme d'action direct ou indirect.

1. Déterminants majeurs de la régulation de l'ovogenèse : quelques exemples

1.1 Régulation du développement ovarien et de la croissance des follicules

1.1.1 Prolifération des cellules germinales

La mise en place correcte de la gonade est fortement dépendante du développement des cellules germinales, influençant directement la fécondité à l'âge adulte. Nous avons vu que chez la femelle, le nombre de cellules germinales augmente via la prolifération cystique (type II) dans les germinal cradles. Une perte de ce mécanisme de prolifération entraîne, chez le médaka, une diminution du nombre de cellules germinales chez les femelles dès l'éclosion, se répercutant sur le nombre de follicules en pré-vitellogenèse et vitellogenèse chez l'adulte. Le gène *ndrg1b* (*n-myc downstream regulated gene 1*), semble impliqué dans la régulation de cette division de type II. Son invalidation provoque une baisse de division cystique chez le mâle et la femelle. A l'âge adulte, il en résulte une diminution du nombre d'ovocytes et du nombre d'ovocytes matures, entraînant une diminution de la fécondité

des femelles (Arias Padilla et al. 2021). A l'inverse, une augmentation du nombre de cellules germinales peut aussi avoir des conséquences délétères sur le développement ovarien. Chez des femelles mutantes *totoro* (*tot*), une hypertrophie des gonades a été observée et l'ovaire est essentiellement composé d'ovocytes immatures (pré-vitellogenèse) chez l'adulte (Morinaga et al. 2004). L'analyse génétique de cette lignée, renommée *hotei*, a mis en évidence que la mutation du récepteur à l'AMH, *amhrll* est responsable de ce phénotype, révélant ainsi un rôle de la signalisation via l'AMH dans le développement des gonades et de la prolifération cellules germinales (Morinaga et al. 2007). D'autres expériences ont suggéré que l'AMH régule la prolifération des cellules germinales capables de s'auto-renouveler qui sont déjà dans une phase active de mitose (prolifération de type I), mais ne contrôlerait pas l'entrée en mitose de ces cellules. L'AMH et *amrhll* étant exprimés dans les cellules somatiques supportrices, cette signalisation semble agir via les cellules exprimant *sox9b*, mais le mécanisme direct de communication n'a pas été identifié (S. Nakamura et al. 2012).

1.1.2 **Rôle de la voie de signalisation TGF- β dans la croissance folliculaire**

Comme l'AMH, d'autres membres de la superfamille TGF- β exercent un rôle de régulation important dans le développement des follicules chez les poissons téléostéens. Ils n'ont pas été étudiés aussi extensivement que chez les mammifères mais de récentes études ont mis en évidence le rôle de *gsdf*, *gdf9* ou *bmp15*, et une étude transcriptomique récente chez le poisson-zèbre semble confirmer un rôle de ces facteurs dans la régulation de l'activation folliculaire (apparition des follicules pré-vitellins) (Zhu et al. 2018).

Gsdf (*gonadal soma-derived factor*) est exprimé dans les gonades de la plupart des poissons téléostéens et a souvent été identifié comme un activateur de développement testiculaire, y compris chez le médaka (Imai, Saino, et Matsuda 2015). Il est cependant aussi exprimé dans les cellules somatiques gonadiques entourant les ovocytes entrant en méiose et en cours de pré-vitellogenèse chez la femelle (Gautier, Le Gac, et Lareyre 2011). Son expression est à un niveau inférieur par rapport aux mâles, mais il aurait néanmoins un rôle dans le contrôle du développement des follicules (Hsu et Chung 2021). Chez le poisson-zèbre, son invalidation entraîne une diminution progressive de la fécondité des femelles, avec une accumulation de follicules immatures dans l'ovaire (Yan et al. 2018). Des observations similaires ont été reportées chez le médaka, avec une répression de l'initiation de la croissance folliculaire après l'entrée en méiose des ovocytes (Guan et al. 2017), ou encore une division de type II des cellules germinales anormale causant une hyperplasie (Wu et al. 2019).

Gdf9 (*growth differentiation factor 9*) est un facteur spécifique des ovocytes, connu pour jouer un rôle essentiel dans la régulation de la folliculogénèse chez les mammifères, notamment pour la progression de la croissance folliculaire (Knight et Glister 2006). Son expression a aussi été observée chez le poisson-zèbre, de manière particulièrement enrichie dans les follicules précoces puis diminuant dans les follicules de stades plus avancés (L. Liu et Ge 2007). Il aurait un rôle suppresseur de l'expression de l'AMH et pourrait promouvoir l'expression de la sous-unité *inhbaa* de l'activine (W. Chen, Liu, et Ge 2017). Les auteurs ont par ailleurs confirmé l'influence de *gdf9* sur *inhbaa* par l'observation d'une diminution importante de son expression dans l'ovaire de femelles invalidées pour *gdf9*. De plus, la perte de *gdf9* s'est traduite par un arrêt complet de la croissance des follicules avant l'apparition de granules

corticales, en croissance primordiale (W. Chen et al. 2022). Ces études contrastent toutefois avec d'autres auteurs n'ayant pas observé de phénotype particulier après invalidation de *gdf9* chez le poisson-zèbre (Dranow et al. 2016).

Bmp15 (*bone morphogenetic factor 15*) est un autre facteur provenant des ovocytes qui aurait un rôle dans la prolifération des cellules de la granulosa. Son invalidation peut causer des phénotypes d'infertilité variables selon les espèces chez les mammifères (Knight et Glister 2006). Chez le poisson-zèbre, il a été mis en évidence récemment un rôle de *bmp15* dans le maintien de la fécondité et la féminisation de l'ovaire. Les mutantes se développent d'abord normalement, puis la croissance des ovocytes s'arrête à des stades précoces et une inversion du sexe a lieu après dégradation des ovocytes. Une diminution de la présence de cellules produisant des œstrogènes a également été observée, suggérant un rôle de *bmp15* dans la capacité de stéroïdogénèse des cellules. Cependant, aucun « master » gène n'ayant été trouvé pour la détermination du sexe chez le poisson-zèbre, il se peut que les mécanismes de réversion du sexe soient un effet secondaire, souvent observé chez le poisson-zèbre dans le cas de dérégulations gonadiques (Dranow et al. 2016).

Bien que les mécanismes d'action des membres de la voie TGF- β ne soient pas tout à fait explicites, en particulier chez le poisson, il apparaît que plusieurs acteurs auraient un rôle dans la régulation de la croissance des follicules, entraînant souvent lors de leur dérégulation un arrêt précoce de la croissance folliculaire, une dérégulation des fonctions de production oestrogénique des cellules somatiques et par conséquent une perturbation plus ou moins intense de la fécondité des femelles. De nombreuses autres voies de signalisation peuvent être impliquées en concert avec la voie TGF- β , comme par exemple la voie PI3K/AKT, connue pour son rôle dans la prolifération, survie cellulaire ou l'activation de la croissance des follicules (De Felici et Klinger 2021). De même, des facteurs de croissance variés peuvent influencer le développement folliculaire, comme il a été montré pour *Igf3* (*insulin growth factor 3*) chez le poisson-zèbre où son invalidation cause un arrêt de la croissance ovocytaire précoce suivi d'une réversion du sexe, avec un lien direct possible avec la signalisation FSH (Y. Xie et al. 2021; J. Xie et al. 2022; J. Li et al. 2021).

1.2 Régulation hormonale et axe gonado-pituitaire

L'ovogenèse et le bon déroulement des mécanismes de fécondation est largement dépendante de l'action des hormones stéroïdiennes. La production de ces hormones est essentiellement réalisée par les cellules somatiques de soutien. Chez les mammifères comme chez les poissons téléostéens, l'axe hypothalamo-hypophysaire joue un rôle important dans la régulation endocrine de la fonction de reproduction. La croissance ovocytaire résulte ainsi d'un grand nombre de mécanismes de communications entre cellules/organes et de boucles de régulation positives ou négatives (ou « feedbacks »).

Les hormones stéroïdiennes sont des acteurs clés de chaque étape de l'ovogenèse, impliquant la différenciation gonadique, la croissance, la maturation et l'ovulation des ovocytes. Elles sont directement dérivées du cholestérol mobilisé dans la membrane interne des mitochondries sous l'action de *star* (*steroidogenic acute protein*). La succession d'actions catalysées par différentes enzymes de la stéroïdogénèse entraîne la formation de stéroïdes biologiquement actifs tels que la $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -DP) aussi connue sous le nom MIH (maturation-inducing hormone), l'estradiol- 17β (E2), la testostérone (T) et la 11-ketotestostérone (11-KT). Parmi les enzymes catalysant la biosynthèse des stéroïdes, *cyp11a1* (P450_{sc} ou cytochrome P450 side-chain cleavage) est la première de la chaîne et est limitante (e.g. irremplaçable) chez les mammifères et les poissons. Une autre enzyme particulièrement étudiée est *cyp19a1* (ou aromatase), responsable notamment de la production d'E2 à partir de la testostérone (Tenugu et al. 2021). La production de ces enzymes et hormones est régulée dans le temps par l'action de neurohormones telles que la FSH (follicle stimulating hormone) et la LH (luteinizing hormone). Dans la section suivante, plusieurs exemples reflétant l'importance de certains de ces acteurs sur le développement ovarien chez le poisson seront abordés, sans toutefois prétendre être exhaustif.

1.2.1 *L'aromatase et le rôle des œstrogènes*

La répression de l'expression de *cyp19* par différents agents exogènes entraîne généralement une baisse de la fécondité, notamment liée à une perturbation de la vitellogenèse (absence de vitellus), un accroissement de l'apparition de spermatozoïdes dans l'ovaire. Une baisse de l'expression des récepteurs à estrogènes (ER- α) et des vitellogenines est aussi souvent observée (Liao et al. 2014; X. Zhang et al. 2008).

Après une mutation induite du gène *cyp19a1*, la production d'E2 est quasi inexistante chez le médaka, et le peu de molécules détectées ne semble pas biologiquement suffisante à induire la production de vitellogenines (Nakamoto et al. 2018). Les ovaires des femelles mutantes se développent d'abord normalement, mais les femelles ne sont pas capables de produire de ponte. Une prolifération anormale des cellules de la granulosa a aussi été observée, et les ovocytes dégénèrent progressivement à partir de 3 mois, avec une augmentation progressive de la spermatogénèse (Nakamoto et al. 2018). D'après ces études, à l'inverse d'autres espèces de téléostéens comme le poisson-zèbre (Guiguen et al. 2010), la production d'œstrogènes, médiée par *cyp19* ne semble pas être indispensable à la différenciation précoce de l'ovaire chez le médaka. En revanche, elle a un impact considérable sur l'accumulation de vitellogenines au cours de la croissance secondaire et sur le maintien de la féminisation au cours du temps. Ces observations sont en cohérence avec une autre étude suggérant que l'*aromatase* n'est pas indispensable à l'ovogenèse précoce chez le médaka, mais impacterait le développement ovarien et notamment la formation de la cavité ovarienne (Suzuki, Tanaka, et Shibata 2004).

Le rôle des œstrogènes peut aussi s'exercer en dehors de l'ovaire, via différents récepteurs à oestrogènes (ESR) présents dans le foie ou le cerveau. Chez les téléostéens, au moins trois types de récepteurs ont été identifiés codés par les gènes *esr1*, *esr2a* et *esr2b*. Contrairement aux mammifères, *Esr1* n'est apparemment pas indispensable au développement ovarien et à la reproduction chez le médaka et le poisson-zèbre, comme l'a mis en évidence une absence de phénotype dommageable après invalidation du gène (Lu et al. 2017; Tohyama et al. 2017). En revanche,

un autre sous-type, *esr2a* semble nécessaire à la mise en place de la morphologie ovarienne et l'évènement de ponte. Une récente étude a en effet observé, après invalidation de *esr2a* chez le médaka, un développement correct des follicules mais l'apparition d'oviductes atrétiques au cours du temps, responsables de l'absence de pontes chez les femelles. Les auteurs ont notamment montré que ce sous-type de récepteur serait responsable du feedback négatif régulant la sécrétion de FSH (follicle stimulating hormone), puisque *fshb* présente une expression plus forte chez les mutantes, et l'expression n'est pas influencée par un traitement à l'E2 à l'inverse des femelles sauvages (Kayo et al. 2019). Cette dernière étude illustre bien l'importance des boucles de régulation liant la production d'œstrogènes, leur voie de signalisation et les gonadotropines dans la régulation de la fécondité.

1.2.2 *Le rôle majeur des gonadotropines*

Chez les téléostéens, les gonadotropines FSH et LH, bien connues chez les mammifères pour leur rôle indispensable dans l'ovogenèse, ont aussi été identifiés. Leur rôle respectif, ainsi que leur dépendance de la stimulation par la GnRH a été récemment étudiée plus en détail chez le poisson-zèbre et le médaka par des expériences d'invalidations de gènes. Chez le poisson-zèbre, il a été montré, via l'analyse de lignées mutées pour leur récepteurs respectifs, que la signalisation FSH est indispensable à la folliculogenèse, alors que la LH est surtout nécessaire aux mécanismes d'ovulation (Z. Zhang et al. 2015). Chez le médaka, les récepteurs à FSH (FSHR) sont détectés dans les follicules en cours de croissance mais pas chez les follicules plus larges, alors que les récepteurs à LH sont détectés dans tous les stades de développement folliculaires (Ogiwara et al. 2013). Chez l'adulte, *FSHR* est fortement exprimé dans l'ovaire, comme *LHR*, et est retrouvé à moindre niveau dans le cerveau alors que *LHR* y est exprimé fortement (Burow 2020). Un pic de LH est estimé chez le médaka *in vivo* entre 15 et 19h avant l'ovulation (Ogiwara et al. 2013). La perte de fonction du récepteur à la FSH (FSHR) entraîne une stérilité des femelles en raison d'un développement ovarien inhibé et une absence de vitellogenèse. L'invalidation de *FSHR* entraîne une suppression de l'expression de *cyp19a1*, et il en résulte une baisse des niveaux d'E2 et de *vitellogenin1* (Murozumi et al. 2014). Les récepteurs FSH et LH, chez les mammifères sont hautement spécifiques envers leur ligand respectif, mais certaines études chez les poissons ont montré qu'une spécificité moins importante pouvait exister chez certains téléostéens conférant ainsi un mécanisme de compensation. Chez le médaka, il a été récemment suggéré, par des expériences *in vitro*, que les ligands conservent une certaine réactivité croisée, avec une activation du *FSHR* possible par des ligands recombinants $Fsh\beta\alpha$ ou $LH\beta\alpha$, et une activation du *LHR* par $LH\beta\alpha$ et, dans une moindre mesure, par $Fsh\beta\alpha$ (Burow 2020).

Une autre étude par KO (knock-out) ciblant les ligands respectifs des récepteurs gonadotropiques a présenté des résultats similaires à l'étude d'invalidation des récepteurs chez le poisson-zèbre et le médaka, avec des follicules arrêtés au stade de pré-vitellogenèse chez des femelles *fshb*-KO. Par l'invalidation de *gnrh1* et *lhb*, les auteurs ont également montré un rôle de ces deux gènes dans le processus d'ovulation, mais pas dans la folliculogenèse puisque les ovaires présentent une croissance et maturation normale des follicules. De plus, ils suggèrent la dépendance de la sécrétion de LH par la stimulation via la GnRH, mais la GnRH ne serait pas indispensable à la signalisation par

FSH. Les femelles des trois différentes lignées KO présentent une stérilité, ce qui démontre le rôle indispensable de ces acteurs dans la régulation de la fécondité (A. Takahashi et al. 2016).

La fécondité, d'après ces quelques exemples, peut ainsi être gravement perturbée suite à la dérégulation de la fonction de stéroïdogénèse, du développement ovarien précoce, de l'activation de la croissance des follicules ou du mécanisme d'ovulation. De nombreux acteurs prennent part au maintien de ces fonctions, incluant des facteurs de transcription, des hormones et leurs récepteurs ou différentes voies de signalisation impliquées dans les processus de prolifération, apoptose ou survie cellulaire. Il apparaît ainsi que les mécanismes régulant l'ovogenèse sont particulièrement complexes et la conservation des processus décrits chez les mammifères reste largement à étudier chez les téléostéens. De plus, certaines fonctions non identifiées chez les mammifères peuvent être élucidées chez le poisson, comme par exemple dans le cas de l'AMH, connu principalement pour inhiber le développement des canaux de Müller, inexistant chez le poisson, et pourtant exprimé de manière similaire dans les gonades mâle et femelle chez le médaka.

2. Rôle des microARNs dans le processus de régulation des gènes contrôlant la fécondité

L'expression des gènes contrôlant des mécanismes essentiels au développement et au fonctionnement normal d'un organisme peut être régulée par de nombreux acteurs. Comme présenté précédemment, il peut s'agir de signaux hormonaux ou de facteurs de transcription. Depuis quelques dizaines d'années, un intérêt grandissant pour un autre type de régulateur, les microARNs, a été observé. Leur origine et modes d'actions ont été rapidement étudiés depuis la découverte de la première évidence de cette classe abondante d'ARNs non codants pour des protéines via la découverte de *lin-4*, un court ARN réprimant la traduction des ARNs messagers *lin-14* et régulant ainsi le développement larvaire de *C.elegans* (R. C. Lee, Feinbaum, et Ambros 1993; Wightman, Ha, et Ruvkun 1993). Le rôle des micro-ARNs dans la régulation de nombreux processus a alors rapidement été mis en évidence, notamment dans les mécanismes de développement ovarien et d'ovogenèse chez les mammifères mais également chez les poissons téléostéens (H. Zhao et Rajkovic 2008; Hossain, Salilew-Wondim, et al. 2012; Hossain, Sohel, et al. 2012; Y. Li et al. 2015; Reza et al. 2019; Bizuayehu et Babiak 2014; Alvi et al. 2021).

2.1 Généralités sur les microARNs

2.1.1 *Définition et mécanismes généraux de biogenèse*

Les microARNs (miRNAs) constituent une classe d'ARNs non codants (ncRNA) de petite taille (~22 nucléotides) retrouvés dans une vaste diversité d'organismes. Ils fonctionnent, comme d'autres petits ARNs, en tant que guides pour la régulation de l'expression de gènes connue sous le nom de « RNA silencing ». Ils se distinguent d'autres ARNs par leur mécanisme de biogenèse à partir de courtes structures tige-boucle (hairpins) aboutissant à la production d'un ARN spécifique. La biogenèse des miRs a été décrite selon deux voies principales : canonique ou non-canonique. Une majorité sont produits selon la voie canonique, impliquant la formation d'un pri-miRNA clivé par un complexe Drosha-DGCR8 (endonucléase-protéines) pour libérer un pre-miRNA dans le noyau. Un second clivage a lieu dans le cytoplasme par l'endonucléase Dicer aboutissant à la perte de la boucle et la formation d'un duplexe qui est ensuite associé à la protéine Argonaute pour former le « Silencing complex » après libération d'un brin qui sera généralement dégradé (miRNA*). Le miRNA dirige ensuite la répression post-transcriptionnelle d'ARNs messagers (mRNA) via leur clivage ou d'autres types de répression de la traduction impliquant différents complexes, comme le raccourcissement de la queue poly(A). (Bartel 2004; 2018). La voie non-canonique de formation des miRNAs implique l'absence de nécessité de clivage par Drosha ou Dicer (O'Brien et al. 2018).

2.1.2 *Mécanismes de ciblage des gènes*

L'action des miRNAs est médiée par l'interaction du complexe et du mRNA cible. Cette interaction a généralement lieu entre une séquence particulière du miRNA, appelée « seed » et des domaines du mRNA retrouvés particulièrement dans la région 3'UTR (Untranslated Region) (Bartel 2009; 2004). La « seed » est généralement identifiée entre les nucléotides 2-7 ou 2-8 dans la région 5' du miRNA. La détermination des cibles est dépendante de différents paramètres de complémentarité de séquences et l'identification précise des interactions *in vivo* n'est pas aisée malgré une variété de méthodes d'analyse et de prédictions. Il existe en effet une multitude de patterns de complémentarité compatibles avec une probabilité d'interaction plus ou moins forte (parfaite, imparfaite), et de nombreux types de séquences MRE (miRNA Responsive Element) ont aujourd'hui été décrits selon la complémentarité totale, la position du ou des mismatch(s), la présence d'un site compensatoire et plusieurs autres variations (Bartel 2004; 2009; 2018; Steinkraus, Toegel, et Fulga 2016). D'autres exceptions de ciblage ont parfois aussi été relevées, comme par exemple des interactions dans le domaine 5'UTR de certains gènes (O'Brien et al. 2018; Breving et Esquela-Kerscher 2010).

Les études suggèrent souvent l'association d'un rôle fonctionnel d'une interaction miR-mRNA qui représentant pourtant une répression assez faible du gène (Lai 2015). Le fold-change serait d'ailleurs souvent inférieur à la variabilité inter-individuelle de l'expression d'un gène (Seitz 2009). Ceci pourrait expliquer l'absence de phénotype observable dans la majorité des cas d'inactivation de miRNA. L'hypothèse d'une répression d'un mRNA médiée par plusieurs miRNA a également été proposée et l'inactivation combinée de plusieurs miRNAs pourrait ainsi avoir de

plus sévères effets, mais des études sont encore à réaliser pour valider ce concept. De plus, différentes théories existent sur la possibilité d'une multiplicité de gènes cibles pour un miRNA donné. Alors qu'il est généralement admis qu'un miRNA pourrait interagir avec de nombreux mRNAs, seules quelques cibles biologiquement actives pourraient être responsables d'une régulation effective. D'autres auteurs penchent pour une régulation fine d'un réseau complexe de gènes (Lai 2015). Enfin, une autre hypothèse, proposant l'existence d'une compétition endogène des séquences MRE pouvant exercer un rôle d'éponge et réguler l'activité biologique des miRNAs (competitive endogenous RNA ceRNA). Dans ce modèle, plutôt qu'une répression médiée par le miRNA sur de nombreuses cibles, il y aurait une grande partie des sites cibles qui seraient en fait des régulateurs de l'activité des miRNAs. (Denzler et al. 2014; Franco-Zorrilla et al. 2007; Steinkraus, Toegel, et Fulga 2016). En conclusion, même si les mécanismes d'action moléculaires sont largement étudiés et mieux connus aujourd'hui, il reste toujours de larges questions ouvertes concernant le type d'action et de régulation de l'activité des miRNAs. Ces hypothèses pourraient notamment avoir de grands impacts sur la manière dont est conduite la recherche de gènes cibles et les méthodes utilisées pour leur validation.

2.1.3 *Méthodes de validation de gènes cibles*

Pour identifier le mécanisme d'action d'un miR, l'identification de ces interactions est d'intérêt majeur et différentes méthodes ont été développées ces 20 dernières années permettant la proposition de mRNAs directement ciblés. Plusieurs caractéristiques sont attendues dans le cas d'une interaction biologiquement fonctionnelle : la répression du mRNA cible est dépendante du miRNA, la complémentarité des séquences (seed-MRE), l'association à la protéine Argonaute, la perte de l'interaction conduisant à un phénotype observable et l'interaction relativement conservée phylogénétiquement (Mockly et Seitz 2019; Bartel 2009). Les méthodes utilisées pour tester ces conditions consistent à :

(1) une prédiction des interactions miRNA-mRNA *in silico* : De nombreux algorithmes ont été développés (miRanda, TargetScan, voir (Steinkraus, Toegel, et Fulga 2016) pour review) avec des critères plus ou moins flexibles de complémentarité de la seed, des critères de filtration différents incluant par exemple la conservation de la cible ou son expression. Ces algorithmes sont cependant limités par la production d'un haut taux de faux positifs et de faux négatifs (Mockly et Seitz 2019; Steinkraus, Toegel, et Fulga 2016; Pinzón et al. 2017).

(2) la mesure du profil d'expression du mRNA cible dans des conditions de perturbation du miRNA : les profils transcriptomiques ou protéiques après un gain ou une perte de fonction d'un miRNA peut diriger vers certains gènes différenciellement exprimés. Les techniques de RT-qPCR, Hybridation *in situ* ou de séquençage sont ainsi souvent utilisées. Toutefois, elles ne permettent pas d'identifier une cible directe ou indirecte du miR.

(3) une immuno-précipitation du complexe Ago-miRNA-mRNA : diverses méthodes comme le CLIP et ses variantes peuvent permettre d'identifier la formation du complexe miRISC.

(4) la mesure de l'expression de rapporteurs artificiels fluorescents : méthode plus populaire utilisée dans de nombreuses études, elle consiste à cloner la séquence du 3'UTR d'intérêt aux côtés d'un rapporteur quantifiable

(luciférase, GFP). L'interaction est alors détectée par la répression de l'expression du rapporteur. Les rapporteurs peuvent être utilisés *in vitro* par transfection ou *in vivo* par transgénèse, dans un contexte où l'expression du miR est réprimée ou sur-exprimée (mutation, compétiteurs d'inhibition, miRNA-mimics). Bien qu'elles permettent d'identifier une interaction fonctionnelle, ces méthodes comportent des biais d'interprétation de la fonction biologique, notamment par exemple en raison d'effets peu spécifiques à concentrations non physiologiques ou de l'accumulation de brin passager (miRNA*) (Søkilde et al. 2015; H. Y. Jin et al. 2015).

(5) une approche génétique inverse ou d'édition du MRE : comme réalisée dans la première étude identifiant *lin-4*, la mutation du gène ciblé par le miR et l'inversion ou la compensation du phénotype macroscopique produit par la perte du miR permet de valider l'interaction et la fonctionnalité biologique. Cependant, les phénotypes forts et viables dans le cas de miRs restent rares et le screen génétique de mutants (à la recherche notamment de mutations des 3'UTR) peut être laborieux. Toutefois, depuis les avancées des méthodes d'édition du génome (TALENs, CRISPR/Cas9), l'induction de mutations précises est possible dans le 3'UTR d'un gène cible potentiel et permet une analyse du rôle d'un miR en conservant le contexte endogène de l'organisme ou la cellule.

Parmi toutes ces méthodes, il apparaît que certaines informent surtout sur la capacité d'interaction physique du miR et du mRNA, tandis que d'autres permettent de distinguer une potentielle fonction biologique. Le challenge retrouvé dans les études concernant le rôle d'un miR dans divers mécanismes reste de concilier ces deux conditions en validant une interaction miRNA-mRNA qui a effectivement une réelle fonction biologique *in vivo*. Ainsi, dans le cas par exemple d'expérimentations de transfection avec des ago- ou antagomirs, l'effet de répression sur un mRNA peut être largement distincte de l'action du miR dans le contexte de régulation endogène complexe. Des auteurs ont d'ailleurs commenté un risque de biais lié à la concentration trop forte, trop basse ou non-physiologique des miRNA-mimics (H. Y. Jin et al. 2015; Mockly et Seitz 2019; Steinkraus, Toegel, et Fulga 2016). De plus, la répression d'un miR n'entraîne que rarement un phénotype clairement observable à l'échelle de l'organisme, alors qu'un nombre important de gènes cibles potentiels (des centaines ou milliers) est généralement détecté par analyse *in silico* (Seitz 2009). Ainsi, il semble que l'approche génétique *in vivo* soit la méthode la plus intéressante pour la validation d'une interaction moléculaire associée à un phénotype observable. La combinaison de différentes méthodes et de rigoureux contrôles semblent à *minima* nécessaires pour proposer un rôle physiologique d'un miRNA. Malheureusement, il semble que de nombreuses études apportent des conclusions souvent hâtives sur le rôle de certains micro-ARNs dans divers processus physiologiques, et les expériences de validation biologique *in vivo* sont encore très rares. De nombreuses études sont d'ailleurs régulièrement rétractées et reflète un certain manque de rigueur dans diverses expérimentations, voire un manque d'intégrité scientifique pour un certain nombre (PubMed). La mise en évidence de leur rôle précis dans une large variété de mécanismes biologique reste ainsi largement confuse, et nombre de « cibles » identifiées peu rigoureusement demanderaient à être confirmées par de nouvelles méthodes *in vivo* permettant l'analyse de la perturbation de l'interaction miRNA-mRNA (Mockly et Seitz 2019).

2.2 Rôle des miRs dans l'ovogenèse

Des expériences de clonage ou de séquençage ont mis en évidence l'expression de nombreux miRNAs dans l'ovaire chez différentes espèces de mammifères (Donadeu, Schauer, et Sontakke 2012) mais aussi chez plusieurs espèces de poissons téléostéens (Alvi et al. 2021). Certains sont particulièrement abondants et/ou exprimés de manière prédominantes dans les gonades.

Le rôle des miRNAs dans diverses fonctions de reproduction ont été plus largement étudiées chez les mammifères que chez les poissons. La régulation de la croissance folliculaire, la maturation et la stéroïdogénèse semble impliquer certains miRNAs, comme l'a suggéré l'expression différentielle de miRNAs variés au cours du développement folliculaire, en réponse à des gonadotropines ou des facteurs de croissance (Donadeu, Schauer, et Sontakke 2012; Reza et al. 2019). Ils auraient une implication dans la stimulation ou la répression de la prolifération cellulaire, de l'apoptose (Tu et al. 2019; Jinbi Zhang et al. 2019) et dans diverses pathologies comme PCOS (Polycystic ovary syndrome), POF (Premature ovarian failure) (Sang et al. 2013; Roth et al. 2014; Kuang et al. 2014; Imbar et Eisenberg 2014) ou le cancer ovarien (Toloubeydokhti, Bukulmez, et Chegini 2008; Y. Li et al. 2015). Les rôles potentiels sont essentiellement dérivés d'études de l'expression différentielle de gènes après invalidation de la machinerie de biogenèse des miRNAs (invalidation de Dicer notamment) ou de miRNAs spécifiques, la plupart proposant des cibles par « validation » *in vitro*.

Chez les poissons téléostéens, plusieurs études ont mis en évidence le pattern d'expression de miRNAs dans l'ovaire mais peu d'études fonctionnelles ont été réalisées. Une attention particulière a été apportée à l'étude du rôle du miR-202 chez différentes espèces (voir partie suivante), et d'autres rares études se sont penchées sur le rôle du miR-430 et de la famille des miR-200s retrouvés en clusters sur le chromosome 23 du poisson-zèbre. Staton et al. ont mis en évidence chez une lignée mutée pour Dicer, via des expériences de rescue et d'injection de morpholinos, un rôle du miR-430 dans la migration des PGCs et la régulation des gènes *sdf1-a* et *cxcr7b* (Staton, Knaut, et Giraldez 2011). Xiong et al. ont montré que le cluster miR-200, dont une partie est exprimée dans l'hypophyse, serait crucial pour la régulation de la maturation ovocytaire et le développement morphologique de l'appareil reproducteur (Xiong et al. 2020).

2.3 Cas particulier du miR-202

2.3.1 *Expression spatiale, temporelle et conservation*

Le miR-202 est l'un des miRNA les plus abondants et exprimé de manière prédominante dans les gonades chez la truite arc-en-ciel (Juanchich 2013), le médaka (Bouchareb et al. 2017; Qiu et al. 2018; Gay et al. 2018) et le poisson-zèbre (Jing Zhang et al. 2017). Son expression prédominante ou exclusive dans les gonades a aussi été observée chez la grenouille (Armisen et al. 2009), le flétan (Bizuyayehu et al. 2012) et plusieurs mammifères (Ro et al.

2007; Landgraf et al. 2007). La découverte de son pattern d'expression particulier et sa relative conservation a entraîné un intérêt spécifique ces dernières années car indiquerait un rôle important dans la régulation de fonctions ovariennes.

Son pattern d'expression temporel ne semble toutefois pas complètement conservé selon les espèces. L'expression différentielle du miR-202 entre les follicules à différents stades de l'ovogenèse a été observée chez plusieurs espèces comme le bovin (Sontakke et al. 2014) ou la truite arc-en-ciel (Juanchich 2013). Chez le poisson-zèbre, son expression augmente dans les follicules au stade de pré-vitellogenèse par rapport aux follicules primaires (Wong et al. 2018). Il semble conservé à des stades de développement avancés, puisqu'il a aussi été détecté par séquençage, aux stades de croissance secondaire et de maturation des follicules (Zayed, Qi, et Peng 2019). Le bras -3p a été détecté de manière dominante dans l'ovaire du poisson-zèbre au cours des premières semaines de développement, alors que le bras -5p domine chez les femelles plus âgées (Presslauer et al. 2017). Chez le médaka, il est détecté dans les follicules de tous stades de développement retrouvés dans les ovaires juvéniles et adultes, et semble progressivement plus enrichi au cours de la croissance folliculaire (Gay et al. 2018). Différentes études s'entendent sur le fait que le miR-202-5p serait hérité maternellement, avec un niveau d'expression rapidement décroissant au cours des premiers stades d'embryogenèse, et un niveau d'expression plus élevé dans le testis que dans l'ovaire (Jing Zhang et al. 2017; Gay et al. 2018). Une étude récente suggère l'héritage paternel du miR-202-3p comme il est particulièrement abondant dans le sperme (X. Wang, Song, et Bhandari 2020).

Au niveau cellulaire, l'expression du miR-202 peut avoir une répartition spatiale distincte dans l'ovaire chez différentes espèces. Chez le poisson-zèbre, le miR-202-5p aurait été détecté par RT-qPCR dans les ovocytes (Jing Zhang et al. 2017), mais l'étude ne fournit pas de méthode spécifiant la séparation de la couche folliculaire des ovocytes avant extraction. Au cours de l'embryogenèse précoce, il a aussi été détecté de manière colocalisée au marqueur *vasa*, indiquant son expression dans les PGCs en cours de migration (Jing Zhang et al. 2017). Selon une autre étude chez le poisson-zèbre, le miR-202-5p a été détecté spécifiquement dans les cellules somatiques des follicules en cours de croissance par RNAseq après isolation de la couche folliculaire (Zayed, Qi, et Peng 2019). Chez le médaka, des expériences d'hybridation *in situ* ont permis de détecter l'expression du miR-202-5p dans les cellules de la granulosa chez les femelles juvéniles et adultes, mais pas dans les ovocytes. Le brin -3p n'a été détecté dans l'ovaire qu'à des niveaux largement inférieurs par rapport au brin -5p complémentaire, par séquençage et RT-qPCR (Gay et al. 2018). L'étude n'exclut cependant pas qu'une expression est possible dans l'ovocyte, à un niveau inférieur au seuil de détection des méthodes utilisées. Dans une autre étude chez le médaka, le miR-202-5p n'a pas été détecté dans les cellules folliculaires mais dans les ovocytes à des stades de développement précoces, à de très faibles niveaux (Qiu et al. 2018). Les niveaux d'expression de miR-202-5p dans l'étude de Gay et al. sont pourtant élevés, et des expériences de RNAseq ont montré une augmentation de son expression dans les follicules de plus en plus matures, de manière cohérente avec d'autres études chez le poisson-zèbre (Gay et al. 2018; Jing Zhang et al. 2017).

Le pattern d'expression du miR-202 n'est pas particulièrement clair selon les espèces, notamment en raison de données contradictoires selon les études et les méthodes utilisées. Cependant, il apparaît dans plusieurs études que

le miR-202-5p serait exprimé particulièrement dans les cellules somatiques entourant les follicules, et l'augmentation de son expression dans différents stades de l'ovogenèse semble ainsi liée à l'augmentation du nombre de cellules constituant les follicules.

2.3.2 *Rôles potentiels du miR-202 dans différents tissus*

Le rôle du miR-202 dans les mécanismes cellulaires de prolifération/apoptose a été étudié dans différents contextes, notamment en cancérologie ou dans les gonades chez les mammifères, proposant plusieurs cibles directes potentielles et des voies de signalisation importantes. De nombreuses études décrivent un rôle du miR-202 dans les processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire. Il est notamment étudié dans plusieurs cas de cancers comme le cancer oral (J. Zhao, Ding, et Zhao 2019), du pancréas (Mody et al. 2017), du sein (Xu, Li, et Hu 2019) ou de l'ovaire (HY et SS 2020). Il est souvent associé à un rôle de suppresseur de tumeurs ou d'inhibiteur de migration cellulaire dans les cancers (J. Wang et al. 2020; J. Zhao, Ding, et Zhao 2019; Zhuang et al. 2020; Deng et al. 2017).

Dans des cellules de patients CML (chronic myeloid leukemia), miR-202-5p est up régulé et serait responsable de la diminution de *USP15* entraînant une inhibition de l'apoptose (Nie et al. 2020). Dans le cancer ovarien, il ciblerait directement *HOXB2* (*Homeobox B2*), un facteur de croissance connu pour promouvoir plusieurs cancers (HY et SS 2020). Un rôle dans la régulation de la voie PI3K/Akt est notamment suggéré dans plusieurs études pour la régulation de la prolifération et l'apoptose des cellules (T. Liu, Guo, et Zhang 2019; Zheng et al. 2021). Dans le cancer de l'utérus, des auteurs ont suggéré *PIK3CA* comme cible directe du miR-202 (Zheng et al. 2021). Les récepteurs TGF- β ont aussi été plusieurs fois suggérés comme cible directe (Ding et al. 2020; Mody et al. 2017).

Dans les tissus gonadiques, plusieurs études ont suggéré un rôle du miR-202 dans la régulation du développement des cellules somatiques gonadiques, notamment dans le testis. Il serait impliqué dans le maintien de l'état indifférencié des cellules souches spermatogoniales via l'inhibition de *Rbfox2* et *Cpeb1* chez la souris (J. Chen et al. 2016). Une autre étude récente confère un rôle du miR-202-3p dans la régulation du développement des cellules de sertoli via l'interaction avec *LRP6* et la *cycline D1* appartenant à la voie Wnt/ β -Catenine (C. Yang et al. 2019). Chez la chèvre, il induirait l'apoptose des cellules de la granulosa par la répression de *TGF β R2* (Ding et al. 2020).

Comme le montre ces quelques études, des rôles dans la régulation du développement cellulaire ont été suggérés pour le miR-202 dans différents tissus chez les mammifères. De plus, une large variété de cibles directes a été proposée à partir de prédictions *in silico* et de données différentielles d'expression. Cependant, dans la majorité de ces études, l'interaction entre le miR-202 et les mRNA potentiellement cibles est testée par des méthodes *in vitro* sur cultures de cellules. Dans les gonades, peu d'études ont été réalisées dans l'ovaire en comparaison au testis et ne permettent pas de proposer un rôle conservé chez les deux sexes. De mon point de vue, ces études ne permettent ainsi pas de valider complètement le rôle des cibles potentielles dans un contexte *in vivo*, ni de bien comprendre le rôle du miR-202 en conditions normales dans l'ovaire.

2.3.3 Rôles et gènes cibles potentiels dans l'ovogenèse chez les téléostéens

Malgré son pattern d'expression abondant et spécifique dans les ovaires, il y a encore un nombre relativement faible d'études s'intéressées à l'analyse fonctionnelle du miR-202 dans l'ovaire *in vivo*. Une étude récente d'expression chez le poisson-zèbre propose un rôle dans l'activation de la croissance folliculaire, et propose un gène cible, mais n'a pas réalisé d'étude fonctionnelle (Wong et al. 2018, 202). Des analyses chez le poisson-zèbre ont suggéré un rôle de miR-202 dans la régulation de la migration des PGCs (Y. Jin et al. 2020) ou dans l'embryogenèse précoce (Hu et al. 2022). Une autre étude, réalisée chez le médaka adulte, a mis en évidence son rôle dans la régulation de la croissance folliculaire et la fécondité (Gay et al. 2018).

Wong et al ont mis en évidence, par une analyse transcriptomique, une expression différentielle de miR-202-5p entre les stades de follicules primaires et en cours de pré-vitellogenèse (i.e, follicules activés). Ils ont ensuite prédit et testé l'interaction *miR-202-5p::c23h20orf24* dans des cellules HEK293 via un système de rapporteur luciférase. Les auteurs suggèrent un rôle du miR-202 dans la rupture de la dormance des follicules primaires, via l'inhibition de *c23h20orf24* lorsque le miR-202 s'exprime plus fortement au cours de l'activation folliculaire (Wong et al. 2018). Les auteurs ne présentent cependant aucune donnée fonctionnelle permettant de confirmer ce rôle.

Jin et al n'ont pas observé de perturbation de la fécondité majeure par croisements de parents mutés pour le miR-202, où l'expression du brin -5p mature est absente et le brin -3p présent uniquement à un très faible niveau. Une perturbation du développement des PGCs a cependant été décrite, comprenant une réduction de leur nombre et une localisation anormale dans le cas d'une perte du miR-202-5p maternel. Le gène *cdc42se1* (*cdc42 small effector 1*) a été prédit comme cible *in silico*, et par des expériences incluant des rapporteurs fluorescents *in vitro*, l'analyse de l'expression de *cdc42se1* après mutation du site d'accrochage du miR-202 et une relative phéno-copie après surexpression de *cdc42se1* (Y. Jin et al. 2020). L'ensemble de leurs résultats, rendent l'hypothèse d'une interaction miR-202-5p-*cdc42se1* plutôt convaincante. Toutefois, comme souligné par les auteurs, le « rescue » du phénotype par répression de *cdc42se1* via un morpholino n'a pas pu être observé, suggérant l'existence d'autres gènes dérégulés lors de la perte de fonction du miR-202.

Hu et al ont récemment suggéré que le miR-202-3p, mais pas le miR-202-5p avait un rôle dans l'activation de génome zygotique (ZGA) au cours de l'embryogenèse au stade mi-blastula. La perte du locus complet du gène *miR-202* entraîne, dans leur étude, la terminaison du développement embryonnaire de 90% des embryons entre 4 et 6 heures post-fécondation, et aucun développement au-delà de 12h post-fécondation. Une augmentation de l'apoptose a été observée, ainsi qu'une diminution des mécanismes d'adhésion cellulaire. Les auteurs proposent trois gènes cibles *nfkbiaa*, *perp* et *mgll* après analyse de l'expression différentielle des gènes et l'observation d'un certain nombre surexprimés. Un phénotype relativement similaire a été obtenu chez des embryons sauvages après injection des mRNA spécifiques ou d'une mixture, validant l'implication de leur dérégulation dans l'apparition du phénotype (Hu et al. 2022). Cependant, aucune expérience de déstabilisation des séquences cibles n'a été réalisée *in vivo* et seules des expériences sur cellules HEK293T ont été réalisées pour tester l'interaction directe miR-202-3p et les gènes cibles potentiels.

Gay et al ont montré que l'inactivation du miR-202 chez le médaka entraîne une baisse importante de la fécondité des femelles avec notamment une dérégulation de la fréquence de ponte et un ratio de 85% de femelles sous fertiles/15% stériles. Par une analyse de la composition des ovaires de médaka sur coupes, une dérégulation de la distribution folliculaire a été observée. Chez les femelles juvéniles, les follicules en cours de pré-vitellogenèse sont significativement enrichis chez les mutantes. Chez les femelles adultes, il y a un nombre plus faible de follicules en début de vitellogenèse dans le cas des mutantes sous-fertiles, et une diminution importante du nombre de follicules plus développés chez les femelles stériles. Les gènes associés à la stéroïdogénèse tels que *cyp19*, *cyp17* sont exprimés à des niveaux plus faibles chez les mutantes, ainsi que des marqueurs des cellules germinales et somatiques comme *foxl3* et *foxl2* (Gay et al. 2018).

2.3.4 *Un rôle majeur dans l'ovogenèse à explorer*

L'étude de Gay et al a révélé un phénotype de fécondité relativement fort lié à la perte d'un miRNA unique, et met ainsi en évidence l'importance du miR-202 et les voies de signalisation qu'il pourrait réguler. Des rôles différents semblent s'être développés au cours de l'évolution, comme le phénotype chez l'adulte développé chez le médaka n'apparaît pas chez le poisson-zèbre. Le phénotypage macroscopique réalisé par Gay et al n'a cependant pas été présenté aussi précisément chez le poisson-zèbre, et les différences de rythme et de type de ponte entre ces deux espèces pourrait limiter la mise en évidence d'une dérégulation de la ponte chez le poisson-zèbre. A l'inverse, des mécanismes impliqués dans l'embryogenèse précoce semblent être plus particulièrement influencés chez le poisson-zèbre, alors que chez le médaka une perturbation de la capacité de fécondation a plutôt été observée, mais l'étude du phénotype précoce au cours du développement embryonnaire ou larvaire n'a pas été réalisé.

Pour mieux comprendre le rôle du miR-202, à l'échelle moléculaire, l'objectif reste à terme d'identifier le ou les *mRNA(s)* directement ciblé(s) et responsables du phénotype observé par la dérégulation du miR. Comme expliqué précédemment, les gènes cibles potentiels prédits *in sillico* peuvent être particulièrement nombreux. De plus, la validation, seule, d'une interaction miRNA-mRNA ou de la formation du complexe RISC ne constitue pas une preuve suffisante de fonctionnalité *in vivo*. Idéalement, l'addition de différentes expériences de validation (rapporteur, précipitation, inactivation de la séquence cible, phénocopie, rescue) permettraient de confirmer un rôle physiologique. Cependant, en l'absence d'indices précis de voies de signalisation dérégulées, il est difficile en routine de tester la phénocopie après inactivation d'un nombre conséquent de gènes cibles potentiels. Comme nous l'avons vu, la perte de différents gènes comme *gsdf*, *FHSR* ou *AMH* peuvent entraîner des phénotypes relativement similaires à celui observé chez le médaka. Ainsi, de nombreux gènes et mécanismes différents peuvent être à l'origine d'une dérégulation de la distribution folliculaire, qu'ils soient directement régulés par le miR-202 ou indirectement perturbés lors de sa perte de fonction.

D'après l'étude de Gay et al, le miR-202 aurait un rôle dans le développement folliculaire précoce, mais il reste difficile d'attribuer les dérégulations à un mécanisme particulier de l'ovogenèse. La dérégulation de la distribution

folliculaire est-elle directement héritée d'un problème de développement précoce de l'ovaire ? Y-a-t-il un dérèglement des mécanismes de recrutement des follicules en croissance ou en maturation ? La croissance folliculaire est-elle directement perturbée par des défauts de développement de la couche de cellules somatiques ?

Partie III : Aspects dynamiques de l'ovogenèse

L'étude de la dynamique de l'ovogenèse s'inclut dans une démarche de recherche de compréhension des rythmes de croissances des follicules, des mécanismes de recrutements entre divers stades de l'ovogenèse et de leurs liens avec la détermination de la fécondité. Les recherches sur les poissons téléostéens dans ce domaine a notamment pris de l'ampleur dans l'objectif de caractériser la fécondité d'espèces sauvages à valeur commerciales et les modifications observables avant, pendant, ou après la saison de reproduction. De plus, la remarquable diversité des stratégies de reproduction retrouvée chez les poissons en fait un bon modèle d'étude des mécanismes de recrutement ovocytaire, notamment par l'existence de modalités de pontes uniques, multiples ou à intervalles variés au cours d'une période de reproduction active.

Dans cette partie, je présenterai les différents aspects de la dynamique ovocytaire décrits chez les poissons et la participation de différentes études au gain de connaissances concernant les rythmes de croissance et de recrutements des ovocytes. Les méthodes ayant permis ces analyses et leurs limites seront également abordées, tout comme les aspects dynamiques encore peu compris qui pourraient bénéficier de nouvelles méthodes d'analyse modernes.

1. Classifications de l'ovaire pour l'évaluation de la fécondité

La dynamique de croissance des ovocytes peut être vue, selon Wallace et Selman (Wallace et Selman 1981), sous quatre aspects : la taille des ovocytes, le type d'organisation des follicules dans l'ovaire (synchrone, groupe-synchrone, asynchrone), le type de recrutement des follicules et le phénomène d'atrésie folliculaire. L'ovogenèse présentera ainsi des rythmes adaptés à une croissance des ovocytes plus ou moins extrême (les œufs pouvant varier de 0.3mm à plus de 80mm de diamètre selon les espèces), une croissance synchronisée ou non et régulée par les entrées (recrutement) et sorties (ponte et atrésie) de follicules (Wallace et Selman 1981). Une autre notion liée à la compréhension de la dynamique ovarienne a également été décrite et largement discutée au fil des années : le type de fécondité (déterminée/indéterminée), représentant la manière dont est défini le nombre d'ovocytes destinés à être pondus lors d'une période de reproduction donnée (Murua et Saborido-Rey 2003).

1.1 Types de synchronisme de ponte et de croissance ovocytaire

En fonction de la stratégie de reproduction, différentes dynamiques de croissance peuvent exister chez les poissons, notamment si les femelles réalisent un seul cycle de reproduction (sémelpares ou monocycliques) ou plusieurs fois au cours de leur vie (itéropares ou polycycliques) (Murua et Saborido-Rey 2003). Au sein de ces deux groupes, différents modes de ponte ont aussi été distingués. Une ponte « totale » caractérise une ovulation des

ovocytes matures au cours d'un épisode unique, ou sur une courte période au cours d'une saison de reproduction. Une ponte par lots (ou « batch spawners ») définit l'ovulation séquentielle des ovocytes matures qui s'étend sur une période plus prolongée au cours de la saison (Tyler et Sumpter 1996; Pavlov, Emel'yanova, et Novikov 2009; Murua et Saborido-Rey 2003). Un batch (ou « clutch ») correspond donc à un groupe d'ovocytes de croissance relativement synchronisée qui seront ovulés sur une période courte (Heins et Brown-Peterson 2022). Les pontes par batch présentent alors un mécanisme de recrutement cyclique d'ovocytes destinés à chaque épisode de ponte, recrutement souvent considéré à partir de la croissance secondaire des follicules (Wallace et Selman 1981; Murua et Saborido-Rey 2003). La saison de reproduction est ainsi définie comme la période entre le premier recrutement de follicules en croissance secondaire et l'ovulation des derniers ovocytes, qu'ils soient pondus en une seule fois ou plusieurs batchs (Kostas Gantias et Lowerre-Barbieri 2018).

Le concept d'organisation ovarienne de type synchrone, groupe-synchrone ou asynchrone a été décrit par plusieurs auteurs en analysant la distribution des follicules selon leur stade de développement dans l'ovaire chez les femelles en reproduction active (Kostas Gantias et Lowerre-Barbieri 2018). Dans le cas des groupe-synchrones, différentes variations sont décrites selon les auteurs (**Figure 9**). En période de reproduction, l'ovaire peut être constitué de deux groupes très distincts, les ovocytes de très petite taille (pré-vitellins) en tant que réserve, et un large groupe d'ovocytes en fin de vitellogenèse qui seront ovulés dans une saison, de manière totale ou par batch (Yamamoto et Yamazaki 1961; Kostas Gantias et Lowerre-Barbieri 2018). Pour d'autres, une claire séparation peut seulement être observée entre le pool représentant le prochain batch (ponte) et un groupe plus hétérogène de follicules de moindre taille (Wallace et Selman 1981; Kostas Gantias et Lowerre-Barbieri 2018). Cette dernière description peut cependant porter à confusion et se rapprocher de la description de la distribution ovarienne de type asynchrone (Yamamoto et Yamazaki 1961; Murua et Saborido-Rey 2003). Ces descriptions, bien que permettant une représentation intuitive de l'organisation ovarienne, ne permettent ainsi pas toujours une compréhension précise des rythmes de croissance des follicules et peut limiter l'estimation de la fécondité selon le critère définissant le « groupe » destiné à la ponte.

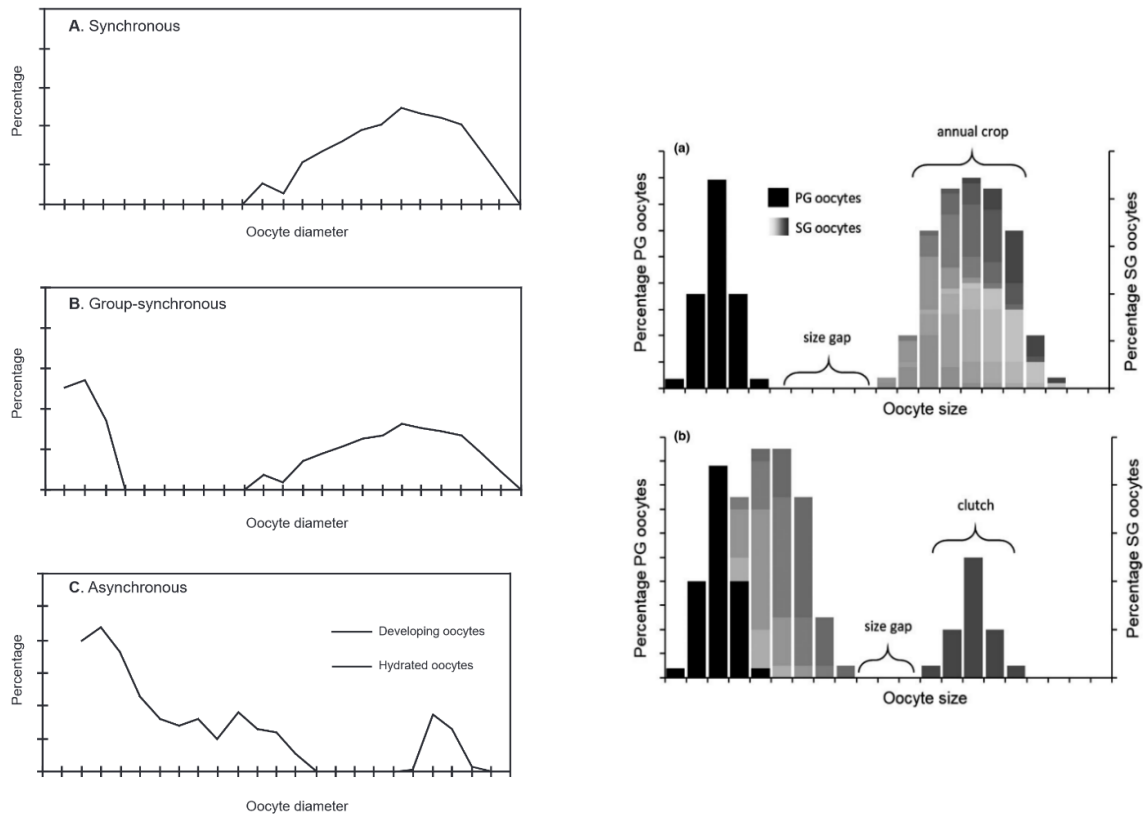


Figure 9: Types d'organisation de l'ovaire chez les poissons téléostéens. (Gauche) Exemples théoriques de fréquence de distribution par tailles d'ovocytes décrivant trois types d'organisation : synchrone (A), groupe synchrone (B) et asynchrone (C). (Droite) Différentes représentations du type groupe-synchrone selon les définitions dans la littérature relevées par Ganiyas et al. (a) un groupe de larges follicules destinés à la production totale d'une saison directement délimité d'un second groupe d'ovocytes très petits. (b) un groupe de larges ovocytes synchronisés constituent le batch de ponte et est clairement séparé d'un groupe plus hétérogène de follicules plus petits servant au recrutement du batch. Notez une similarité entre les profils de distribution du type asynchrone (C, gauche) et d'une des représentations d'un groupe-synchrone (b, droite). Extraits de (Murua et Saborido-Rey 2003) (Gauche) et (Kostas Ganiyas et Lowerre-Barbieri 2018) (Droite).

Chez le médaka, l'ovaire est identifié comme asynchrone, présentant une population hétérogène de follicules sans organisation particulière (hormis le batch destiné à pondre), mais Egami (Wallace et Selman 1981) décrit différents pools d'ovocytes vitellins identifiables comme les prochaines pontes. Ainsi, son appartenance à un asynchronisme a parfois été remis en cause (Wallace et Selman 1981). Peu d'analyses du contenu ovarien global ont été menées chez le médaka, alors que son cycle de ponte rapide (24h) et la facilité de suivi en laboratoire en font un modèle particulièrement intéressant pour la compréhension de la dynamique ovarienne et son évolution. Chez l'adulte en cours de reproduction, les distributions des follicules n'ont été analysées qu'à partir des follicules relativement larges (300-500 μm) et ne permettent pas d'évaluer la contribution des follicules pré-vitellins au cours

du cycle de ponte. De plus, les observations de l'évolution des follicules pendant la maturation ne semblent pas concorder entre les auteurs, avec parfois la description de « vagues » de follicules vitellins destinés aux prochaines pontes et d'autres fois la démarcation unique du batch de ponte (**Figure 10**) (Wallace et Selman 1981; T. Iwamatsu 1978). L'organisation des cycles de pontes chez le médaka reste ainsi encore mal expliquée et des questions subsistent : la croissance folliculaire est-elle continue pour tout un groupe de follicules destinés à la ponte ? Y-a-t-il différentes réserves ou phases relativement stationnaires à partir desquelles sont recrutés les follicules pour la croissance ou uniquement pour la ponte ?

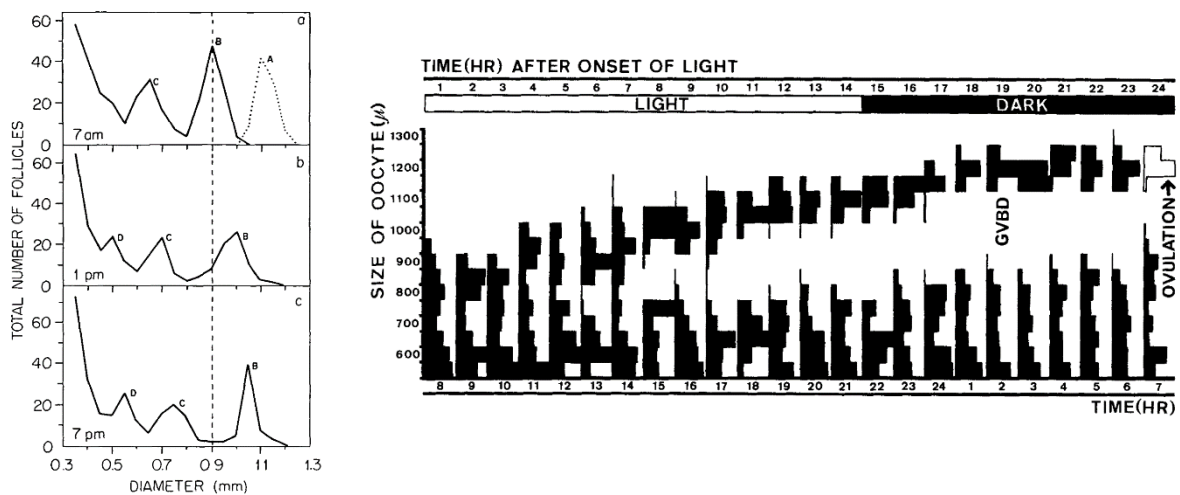


Figure 10: Deux modèles de dynamique de croissance différents chez le médaka retrouvés dans la littérature. (Gauche) Fréquence de distribution des follicules de diamètre $>0,35$ mm dans des ovaires examinés à trois moments différents de la journée ($n=3$). Les lignes pleines représentent les follicules et les lignes pointillées les œufs ovulés. La ligne verticale en pointillés représente la transition entre la vitellogenèse et la maturation. (Droite) Croissance des gros ovocytes (plus de 550 μm de diamètre) pendant le cycle circadien de la ponte. La distributions ovocytes dans l'ovaire à chaque moment est représenté en pourcentage. Notez qu'à gauche, des pools distincts de follicules sont décrits entre 300 et 900 μm identifiant les prochains batchs, alors qu'à droite, aucun pool de follicules ne peut être distingué nettement en dessous de 800 μm . Extraits de (Wallace et Selman 1981) (Gauche) et (T. Iwamatsu 1978) (Droite).

1.2 Fécondité déterminée ou indéterminée

Au fil des années, l'organisation de l'ovaire, représentée par la distribution folliculaire, a été fréquemment associée à différents types de fécondités. Une fécondité « déterminée » est associée à un nombre fixe, défini avant la saison reproductive, des follicules destinés à être pondus au cours de cette période. Dans ce cas, c'est le groupe d'ovocytes en croissance secondaire qui est alors pris en compte (vitellogénèse ou gonadotropine-dépendants). Par conséquent, le nombre d'ovocytes vitellins est en théorie égal au nombre total pondus au cours de la période et il diminue au cours de la saison, en conséquence d'une absence de recrutement à partir des ovocytes primaires (pré-vitellins, constituant la réserve) (J. R. Hunter et Lo 1985; R. Hunter 1992; Murua et Saborido-Rey 2003). De plus, la présence d'un « gap » séparant le pool destiné à être pondus et le groupe d'ovocytes primaires a longtemps été considéré comme un signe de fécondité déterminée (J. R. Hunter et Lo 1985; Konstantinos Ganias 2013; R. Hunter 1992). A l'inverse, une fécondité indéterminée ne présenterait pas de « gap » observable entre les ovocytes de réserve et ceux plus développés. Ce gap peut être observé seulement pour le groupe d'ovocytes matures destinés immédiatement à la ponte (un batch). Les follicules seraient recrutés du compartiment primaire vers le secondaire, au fur et à mesure au cours de la période de reproduction (J. R. Hunter et Lo 1985; Murua et Saborido-Rey 2003; Pavlov, Emel'yanova, et Novikov 2009). Par conséquent, les espèces dites synchrones et groupe-synchrones ont souvent été associés à une fécondité déterminée à recrutement ponctuel précédent la reproduction active, alors que les asynchrones ont été largement associés à une fécondité indéterminée à recrutement persistant durant la période de reproduction (Wallace et Selman 1981; Murua et Saborido-Rey 2003).

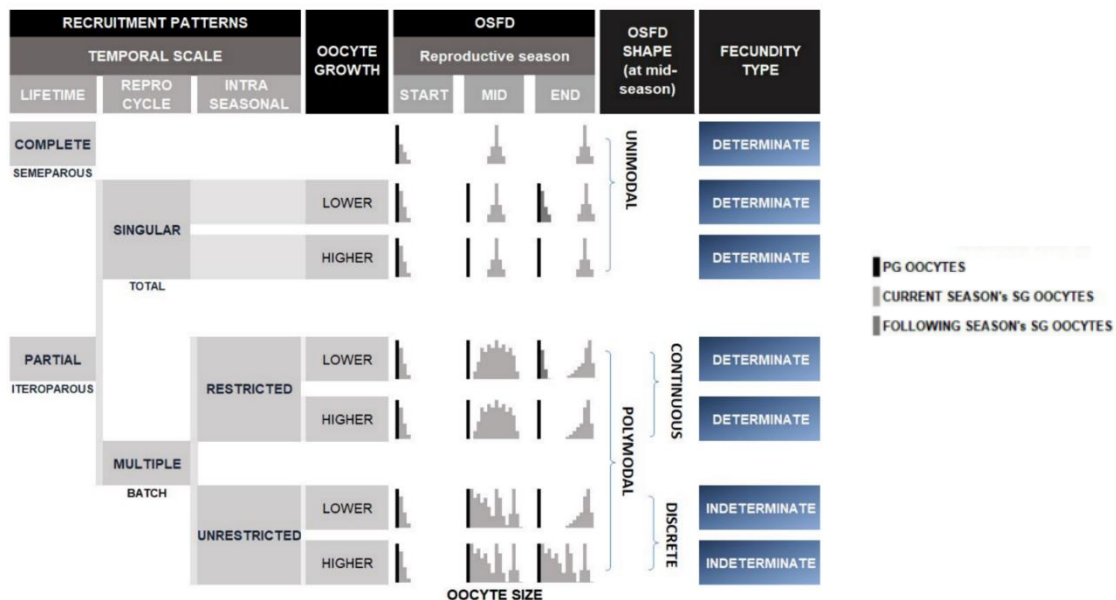


Figure 11: Paramètres caractéristiques de la fécondité chez les poissons téléostéens. Diagramme de différentes combinaisons de schémas de recrutement d'ovocytes par échelle temporelle (vie entière, cycle de reproduction, intra-saisonnier) et de taux de croissance des ovocytes (plus faibles vs. plus élevés) conduisant à différentes distributions de fréquence de taille d'ovocytes et à différents types de fécondité (déterminés ou indéterminés). Extrait de (Kostas Ganias et Lowerre-Barbieri 2018).

1.3 Evolution des conceptions et avantage du modèle de laboratoire

Comme nous l'avons vu, les concepts de synchronisme de croissance ovocytaire et de détermination de la ponte ont souvent été associés pour la description des capacités reproductrices chez les téléostéens. Cependant, les critères traditionnels ont parfois résulté en une classification confuse ou incorrecte. Chez le maquereau Atlantique (*Scomber scombrus*) par exemple, une étude a souligné une inadéquation de toutes les observations à un seul type de fécondité déterminée/indéterminée. Les auteurs ont alors proposé d'autres critères de mise en évidence, tels que l'évolution du recrutement ovocytaire et le pattern d'atrésie au cours de la saison, ou la durée de la croissance secondaire en relation avec la durée de la saison de reproduction. Dès lors, les auteurs ont pu catégoriser cette espèce en type déterminé (Greer Walker, Witthames, et Bautista de los Santos 1994). Des critères plus divers sont alors adoptés dans les prochaines études (Konstantinos Gantias 2013). Malgré cela, la remise en question des critères de classification et de terminologie reste assez fréquente. Gantias et *al.* proposent notamment d'abandonner les conceptions confuses de synchronisme de croissance et d'ajouter la prise en compte de l'intervalle de ponte et de la durée de la période de reproduction dans le cas de pontes par batch, sans quoi l'interprétation d'une distribution ovocytaire à un temps unique de prélèvement serait faussée (**Figure 11**) (Kostas Gantias et Lowerre-Barbieri 2018; Heins et Brown-Peterson 2022). Depuis l'utilisation de méthodes d'analyses plus modernes (voir partie 3), des auteurs réfutent dorénavant la classification « déterminée » traditionnelle chez le maquereau (dos Santos Schmidt et al. 2021; Konstantinos Gantias et al. 2017). Chez le Merlu européen, une étude récente montre que le pool « déterminé » pour la saison de reproduction serait constitué de manière précoce, avant la vitellogenèse (Serrat et al. 2019).

Les discussions régulières concernant les critères d'analyse de la dynamique ovarienne et de la fécondité révèlent la nécessité d'autres études pour clarifier le lien entre la croissance des follicules, leur recrutement à un stade donné et leur contribution à une ponte unique ou l'ensemble des pontes au cours d'une période de reproduction active. L'utilisation d'espèces sauvages a certainement eu son intérêt dans l'évolution des méthodes d'estimation pour la production halieutique, mais la compréhension des biorythmes, notamment de recrutements folliculaires, bénéficiera grandement d'autres études en milieux et périodes reproductives contrôlées sur des espèces modèles de laboratoire. Le médaka constitue notamment un modèle intéressant pour l'étude des rythmes rapides de ponte et les mécanismes sous-jacents de recrutements et de croissance permettant d'alimenter ces pontes journalières pendant une période de reproduction active prolongée.

Le concept de synchronisme, groupe-synchronisme ou asynchronisme semble assez intuitif pour la description de la relative hétérogénéité des stades de développement retrouvés dans l'ovaire. Toutefois, il peut souvent porter à confusion et entraîner une interprétation hâtive des rythmes de recrutements. Il faut en effet pouvoir distinguer différents types de recrutements qui peuvent être soit directement lié à la production d'une ponte (batch), ou réalisé pour la création ou le soutien d'une réserve de follicules. De plus, l'analyse de la fécondité, selon la période temporelle considérée, peut apporter des conclusions différentes. Le médaka, par exemple, pond relativement peu

d'œufs à chaque ponte, mais semble pouvoir soutenir un rythme de production particulièrement rapide et sur une durée prolongée. Comparée à une ponte fournie d'une ou plusieurs centaines d'œufs chez le poisson-zèbre, le médaka peut ainsi posséder une fécondité largement inférieure. Cependant, lorsque la fréquence de ponte optimale est prise en compte, les deux espèces peuvent avoir une fécondité se rapprochant pour une période prolongée d'observation. Le concept de détermination de la fécondité est également particulièrement utile pour l'estimation de la fécondité d'une espèce au cours de la vie ou d'une saison. Elle dépend, cependant, de l'identification d'un recrutement actif d'un pool de réserve et de la différenciation entre un recrutement destiné à la saison (définissant la fécondité déterminée) ou d'un recrutement destiné à un batch de ponte (pouvant avoir lieu chez des espèces dites déterminées ou indéterminées). Il reste ainsi différentes questions peu étudiées ou mal comprises : à partir de quelle réserve peut-on considérer et évaluer la fécondité sur une saison ? Est-elle formée précocement ou renouvelée à chaque cycle de ponte, à chaque saison ? Les espèces asynchrones sont-elles forcément indéterminées ?

Il est ainsi relativement important à mon sens, dans l'étude de la fécondité et de la dynamique ovarienne et particulièrement pour les espèces possédant des ovaires très hétérogènes, de considérer l'analyse du contenu ovarien à différents temps du cycle de vie et notamment à différents temps de la période reproductive pour mieux appréhender le caractère synchronisé/déterminé ou non de la croissance folliculaire.

2. Modalités de réarrangements du contenu ovarien

2.1 Les différents types de recrutements

Le recrutement des follicules entre différentes phases de croissance est, nous l'avons vu, un paramètre central déterminant la dynamique ovarienne et la fécondité des femelles. Cependant, il peut avoir lieu à partir de différentes réserves et être considéré comme continu ou discontinu au cours du cycle de vie ou de la période de reproduction. Il peut être « partiel » ou « total » selon si le pool de follicules de réserve subsiste ou est complètement utilisé au cours du recrutement, mais les espèces itéropares présentent généralement un type de recrutement partiel (Kostas Ganiats et Lowerre-Barbieri 2018).

2.1.1 Recrutement de follicules en croissance et formation du batch de ponte

Chez les espèces à fécondité déterminée, les études se sont concentrées sur la recherche du recrutement du pool de follicules qui définit la fécondité pour une période de reproduction. Il a souvent été considéré que ce recrutement correspondait au passage de la croissance primaire à la croissance secondaire chez plusieurs espèces (Brown-Peterson et al. 2011; Heins et Brown-Peterson 2022; Lowerre-Barbieri et al. 2011). Cependant, certaines

études ont montré que les ovocytes destinés à la ponte d'une saison pouvaient provenir d'un recrutement plus précoce, notamment avant le dernier stade de pré-vitellogenèse (Olav S. Kjesbu, Thorsen, et Fonn 2011; Serrat et al. 2019). Ces conclusions dérivent directement de l'observation d'un profil d'enrichissement avant la ponte, suivi d'une décroissance après la ponte, correspondant ainsi à un « pulse » identifiable.

Chez les espèces à fécondité indéterminée, de telles analyses sont plus complexes, puisque les distributions folliculaires restent assez hétérogènes au cours du temps et les cycles de recrutement/développement se succèdent rapidement. Un pattern de recrutement différent a été suggéré, et certains auteurs ont ainsi proposé que le recrutement soit constant au cours du temps (Korta et al. 2010; Konstantinos Ganias 2013). Cependant, la majorité des études s'est intéressée uniquement à la formation du pool de follicules destiné à la ponte pour pouvoir estimer la fécondité au cours d'une saison de reproduction. Alors qu'historiquement, la séparation entre le batch et le reste des ovocytes en développement a été identifiée au moment de l'hydratation des follicules matures (J. R. Hunter et Macewicz 1985), des récents travaux ont identifié une séparation du batch à partir de la vitellogenèse tardive ou à partir de 600 μm de diamètre (Konstantinos Ganias et al. 2004; 2017; Nyuji et Takasuka 2017).

L'analyse des mécanismes de recrutement a été largement limitée à des échelles de temps prolongées tel que la saison de reproduction, mais quelques études se sont concentrées sur un cycle unique d'ovulation et apportent une meilleure compréhension de cette dynamique. Des auteurs ont suggéré chez l'anchois européen que le recrutement en croissance primaire correspondrait à des *pulses* rapides vers la vitellogenèse, activés lors de la phase d'hydratation du batch en cours (Schismenou et al. 2012). Plus récemment, il a été montré chez le *A. macedonica* que le recrutement de follicules précoces semble synchronisé avec l'ovulation du batch en cours et conduit à un équilibre de la dynamique ovarienne (Mouchlianitis, Minos, et Ganias 2020).

2.1.2 ***Recrutement de follicules néo-formés***

Le recrutement précoce des follicules à partir des ovogonies a été peu étudié de manière quantitative, alors que la persistance de cette activité de néo-ovogenèse est une caractéristique particulièrement intéressante chez les téléostéens pour la compréhension de la dynamique ovarienne. Chez le médaka, cette activité de cellules souches a été démontrée chez l'adulte dans les structures alors appelées « germinal cradles » (S. Nakamura et al. 2010; Shuhei Nakamura et al. 2011). Les auteurs ont estimé le nombre de germinal cradles à environ 600 sur la surface d'un ovaire mature, par un comptage sur un quart de l'ovaire et multiplié ensuite par 4. Après un traitement au busulfan limitant la prolifération des cellules germinales à l'origine des ovocytes nouvellement formés, les auteurs ont toutefois observé une conservation de la fécondité des femelles pendant plusieurs mois. Chez le poisson-zèbre, un rôle des cellules germinales souches a été montré pour la régénération de l'ovaire après ablation chez des femelles juvéniles (1 mois post-fécondation) (Cao, Mao, et Luo 2019). Dans une autre étude chez *P. maculatus* et *S. maculatus*, présentant des stratégies de reproduction différentes, une augmentation du nombre de niches contenant des ovogonies en cours de prolifération ou des ovocytes isolés néoformés a été suggérée au cours des phases de régénération après reproduction. La production de cellules germinales chez *S. maculatus*, espèce à

fécondité indéterminée et cycle de ponte prolongé, semble cependant plus discrète que chez *P. maculatus* ayant une fécondité déterminée et une saison de ponte plus courte (Wildner, Grier, et Quagio-Grassiotto 2013).

2.2 Rôle de l'atrésie et perturbations de la dynamique ovarienne

2.2.1 *Apoptose et atrésie folliculaire*

L'atrésie est un mécanisme de résorption des follicules avant l'atteinte de la maturité complète. Chez les mammifères, un phénomène d'atrésie est bien connu lors de la « sélection » du ou des follicules matures destinés à ovuler et une large part des follicules accumulés pendant la phase pré-pubertaire subira une dégénérescence (Hussein 2005). Chez les poissons, une implication aussi forte de l'atrésie dans la régulation du contenu ovarien n'a pas été démontrée, mais un rôle dans le développement ovarien a tout de même été décrit chez différentes espèces de téléostéens. Les mécanismes sous-jacents impliqueraient, chez les poissons téléostéens, une induction de l'apoptose, de l'autophagie et de l'hétérophagie, menant progressivement à la dégradation des ovocytes et des cellules somatiques de soutien. Différents stades d'atrésie ont été décrits, incluant une désorganisation de l'enveloppe nucléaire et du chorion, une invasion des cellules de la granulosa réalisant la phagocytose du vitellus et une dégradation des cellules de la granulosa par apoptose jusqu'à résorption complète (J. R. Hunter et Macewicz 1985). Le mécanisme d'apoptose ne semble pas être l'inducteur direct de l'atrésie chez les poissons, alors qu'il constitue un évènement majeur responsable de la dégénérescence folliculaire chez les mammifères (Corriero et al. 2021). Des follicules atrétiques ont pu être observés en cours de pré-vitellogenèse mais sont plus fréquemment retrouvés en cours de vitellogenèse et après ovulation (Corriero et al. 2021; Bromage et Cumarantunga 1988). Chez le médaka, des follicules atrétiques ont été observés pendant au moins trois jours après la ponte, avec un nombre variant de 25 à 40 follicules environ, représentant toujours une faible proportion des follicules (1 à 4%) (Yamamoto et Yoshioka 1964). Le taux d'atrésie peut largement varier en fonction de l'espèce, et être lié à une diminution de la fécondité des femelles lors de dérèglements, notamment sous l'effet de facteurs tels que l'apport nutritionnel, le stress ou divers paramètres environnementaux (Corriero et al. 2021; K. Ganas, Nunes, et Stratoudakis 2008; R. Hunter 1992).

2.2.2 *Modification de la dynamique ovarienne*

La compréhension de la dynamique ovarienne en conditions « idéales » constitue une base de travail importante pour déterminer l'impact, par exemple, de certains paramètres physiques ou environnementaux sur le développement de l'ovaire et la fécondité des femelles adultes. La comparaison des rythmes de recrutements normaux et des recrutements en réponse à un évènement d'ablation permettent par exemple de mieux comprendre comment sont régulées les activations/restriction des cellules germinales en fonction du contexte ovarien. Une

repopulation des ovaires a ainsi été observée chez différentes espèces après ablation d'un type de cellules germinales particulier ou d'une portion entière d'ovaire. Ces expériences révèlent à la fois une possibilité d'auto-suffisance à partir de follicules en croissance accumulés ou une capacité de modification des rythmes de recrutements pour la régénération ovarienne lorsque le pool de follicules subsistant est insuffisant à la récupération d'une fécondité normale (S. Nakamura et al. 2010; Cao, Mao, et Luo 2019; Tyler, Sumpter, et Witthames 1990).

Le pattern de fécondité et l'organisation dynamique de l'ovaire peut également varier en fonction de facteurs environnementaux, comme la durée de la photopériode ou la température de l'eau (Konstantinos Ganas 2013). Il a été montré par exemple chez le médaka qu'un raccourcissement de la photopériode pouvait engendrer une moindre production d'ovocytes matures et un accroissement de la fréquence d'atrésie folliculaire. La baisse abrupte de la température de l'eau (-10°C) n'engendre apparemment pas de cessation directe du développement des ovocytes, mais entraîne une augmentation de l'intervalle de ponte, passant de 24h à environ 3 jours (Koger, Teh, et Hinton 1999). D'autres facteurs comme la densité de poissons, la pollution ou une nutrition pauvre peuvent influencer les rythmes de pontes et entraîner une omission de la ponte au cours d'une saison de reproduction (Rideout, Rose, et Burton 2005).

L'effet de l'âge sur la fécondité a été relativement peu étudié au niveau cellulaire. Quelques études révèlent cependant des caractéristiques différentes selon les espèces. Chez *Platycephalus fuscus*, une dégénérescence des ovaires a été observée chez les femelles âgées (7 ans) avec une présence massive d'ovocytes atrétiques, plus fréquente que chez les femelles de 2 à 6 ans (Pollock, 2019). A l'inverse, chez *Sebastes aleutianus*, l'ovaire comprend une distribution normale de follicules au moins jusqu'à l'âge de 80ans, et aucun signe d'atrésie n'a été observé (de Bruin et al. 2004).

De nombreux paramètres peuvent ainsi influencer la dynamique ovarienne et cette régulation est encore mal comprise. Au-delà de l'impact de paramètres environnementaux, les mécanismes d'adaptation de la croissance folliculaire à un contexte ovarien perturbé sont particulièrement intéressants, de même que l'évolution des capacités reproductives avec l'âge. Les mécanismes de croissance et de recrutements ont souvent été étudiés sur des périodes courtes par rapport au cycle de vie de certains poissons, et ne permettent pas de bien comprendre les modifications des dynamiques pouvant avoir lieu entre la phase de développement précoce (larves), de croissance (femelles juvéniles immatures) et l'âge adulte plus ou moins âgé. A l'inverse, à l'âge adulte, la majorité des études se concentrent sur l'analyse de la dynamique ovarienne au cours d'une saison de reproduction et rares sont celles qui permettent d'appréhender les événements associés à la formation d'un cycle unique d'ovulation. Dans diverses études, le comportement du contenu ovarien a été estimé par la modélisation mathématique de l'ovogenèse, constituant aujourd'hui une ressource prometteuse pour la compréhension des rythmes divers de croissance mais aussi de leur perturbation via différents paramètres modulables. La force de tels modèles bénéficierait largement de données biologiques plus complètes, limitant l'estimation de plusieurs paramètres encore inconnus. Là encore, de nouveaux travaux menés sur une espèce modèle de laboratoire seront utiles pour la production de données

exhaustives concernant la composition et l'organisation de l'ovaire à différents intervalles de temps. Nous verrons dans la partie suivante que la production de telles données a longtemps été limitée par les méthodologies existantes, mais le développement de méthodes modernes ouvre l'accès à des informations plus complètes.

3. Méthodes d'analyse du développement et du contenu ovarien

La compréhension de la dynamique de développement et de croissance des follicules dans l'ovaire nécessite, comme présenté précédemment dans divers exemples, une évaluation de la composition ovarienne à un temps donné. L'analyse du contenu folliculaire, à différents temps du cycle de vie ou du cycle de reproduction, permet notamment d'appréhender les mécanismes de recrutement et de régulation de la dynamique au cours du temps. Cependant, les interprétations de telles études dépendent fortement des méthodes d'analyse utilisées et de leurs limites. Depuis les premières descriptions histologiques des stades de l'ovogenèse, essentiellement utilisées pour des études qualitatives, une grande variété de méthodes a été développée afin d'adopter des approches plus quantitatives, mais beaucoup peinent encore à évaluer la composition totale de l'ovaire, notamment chez les poissons.

3.1 De l'analyse de sous-volumes à la visualisation 3D de l'ovaire intact

3.1.1 Histologie et microscopie 2D, dissociation de follicules

Chez les poissons téléostéens, les techniques d'histologie ont été historiquement utilisées pour décrire les stades de l'ovogenèse, après un marquage Hématoxyline-éosine ou par microscopie électronique (Wallace et Selman 1981; Takashi Iwamatsu 1988). La caractérisation de la maturité ovocytaire via l'observation de sections a été largement utilisée dans les études cherchant à déterminer la fécondité et la maturité reproductive des femelles (West 1990) ou pour des analyses histopathologiques (Blazer 2002). Dans d'autres cas, l'histologie a aussi été utilisée pour réaliser des comptages et établir une fréquence de distribution folliculaire (Emerson, Walker, et Witthames 1990). D'autres méthodes se sont complétées et complexifiées, notamment les méthodes « gravimetric », « auto-diametric fecundity » ou « oocyte packing density » (O. S. Kjesbu et Holm 1994; Thorsen et Kjesbu 2001; Kurita et Kjesbu 2009; Korta et al. 2010). Elles ne seront pas détaillées ici, mais consistent toutes à estimer le nombre d'ovocytes par gramme d'ovaire à partir de comptages réalisés sur coupes histologiques ou ovocytes dissociés. Des calculs d'estimation permettent ainsi l'évaluation de la distribution de follicules par stades de développement, bien que peu d'études incluent les follicules de petite taille dans leurs études. Ces méthodes sont toutefois essentiellement utilisées pour évaluer la fécondité des espèces à valeurs commerciales, où la quantification totale du contenu ovarien est difficilement réalisable.

Chez d'autres espèces modèles comme le poisson-zèbre, on retrouve une utilisation similaire de coupes transversales pour quantifier les follicules par stades de développement, en postulant une répartition homogène des follicules dans l'ovaire (Connolly et al. 2014). Chez le médaka, une quantification a pu être réalisée sur des ovaires adultes entiers à partir de sections sériées (Yamamoto et Yoshioka 1964). Les auteurs ne précisent cependant pas la méthode utilisée pour limiter le comptage répété de mêmes follicules entre différentes sections. Une autre étude, plus récente, s'est intéressée au contenu ovarien au cours du développement larvaire et quantifie les follicules par comptage après dissociation totale des ovaires, mais n'a pas poursuivi jusqu'à l'apparition de la maturité reproductive (Takashi Iwamatsu 2015). Chez d'autres espèces, notamment les mammifères, le recours au dénombrement de follicules sur sections a aussi été utilisé, à partir d'ovaires entiers ou de portions d'ovaires connues (stéréologie) (Soygur et Laird 2021).

Dans de nombreuses études, l'analyse de sections d'ovaires a permis la mise en évidence de dérégulations du développement ovarien, par exemple chez des lignées mutées en analyses fonctionnelles, notamment de manière qualitative (présence/absence de follicules de stades variés, présence de spermatogenèse...). En revanche, cette méthode comporte différentes limites dans le cas d'analyses quantitatives. Pour évaluer le contenu folliculaire total d'un ovaire, elle peut demander un temps considérable d'analyse sur coupes sériées ou nécessiter de larges extrapolations à partir d'une seule section. De plus, la mesure du diamètre ovocytaire peut être biaisée selon la position de coupe sur chaque follicule. Le dénombrement peut également comporter un biais lié à la différence d'encombrement spatial de follicules de diamètres parfois extrêmement distants (20 à 1000 μm), avec un risque de sur- et sous-estimation de la proportion de chaque stade dans l'ovaire entier. Les limites de ces méthodes ne sont pas limitées aux recherches sur les modèles téléostéens ni au domaine de la reproduction. L'analyse quantitative sur images 3D semble avoir ainsi une précision supérieure car limitent les biais d'échantillonnage des tissus (Soygur et Laird 2021). Beaucoup de travaux ont ainsi émergé concernant le développement de nouvelles méthodes permettant d'accéder au contenu volumique (3D) de différents tissus, voire au contenu de l'organe entier.

3.1.2 *La microscopie 3D comme outil d'exploration des ovaires entiers*

L'imagerie d'organes entiers en 3 dimensions (3D) constitue un outil particulièrement intéressant pour l'étude de la morphologie, de l'organisation et de la composition des tissus *in vivo*, et ouvre la voie à la compréhension du développement normal ou pathologique des tissus dans de multiples disciplines. L'utilisation de la microscopie 3D a cependant d'abord été limitée par les propriétés intrinsèques des tissus, notamment les différences d'indices de réfractions causées par des concentrations variables de lipides ou protéines. L'opacité entraînée par une réfraction importante de la lumière est ainsi limitante pour la pénétration en profondeur des lasers en microscopie à fluorescence.

Pour dépasser cette limite, de nombreuses études ont développé des stratégies différentes de transparençation des tissus, notamment adaptés à l'imagerie de cerveau, d'embryons entiers ou d'organismes entiers (Richardson et Lichtman 2015; 2017; Silvestri et al. 2016). La remarquable diversité de ces méthodes ne sera pas exposée ici, mais

notons que chaque étude a proposé une solution originale via l'utilisation de différents agents organiques ou chimiques permettant une délipidation plus ou moins lente des tissus. Chacune présente des forces différentes, notamment pour la conservation de la structure des tissus et la préservation des signaux fluorescents en profondeur. Différentes modalités d'imageries ont aussi émergé et plusieurs auteurs ont pu réaliser des reconstructions d'ovaires entiers, notamment chez des modèles de mammifères (Fiorentino et al. 2021). Les méthodes préexistantes ne suffisent pourtant pas toujours pour l'exploration de certains tissus et nécessitent d'être adaptés selon les propriétés d'un organe donné et les modalités d'imagerie disponibles dans chaque laboratoire. Chez les poissons, les méthodes de transparisation CUBIC et PACT ont pu être appliquées au testis de poisson-zèbre (Frétau et al. 2017; Susaki et al. 2014; B. Yang et al. 2014), mais aucune n'a été testée sur l'ovaire. L'adaptation des méthodes de transparisation sur l'ovaire de poisson s'avère challengée par la forte concentration lipidique associée aux follicules en cours de croissance.

3.2 Evolution des méthodes d'analyse d'images pour la quantification d'images 3D

Dans les paragraphes précédents, des méthodes de dénombrement et de mesures des follicules ont été citées, mais consistent essentiellement à un travail manuel ou des extrapolations par des calculs d'estimations. Ici, j'introduirai des méthodes alternatives permettant l'extraction d'informations d'images biologiques, rendues de plus en plus automatiques ces dernières années. J'aborderai également leurs limites et avantages dans un contexte d'images de microscopie optique, généralement à fluorescence, et en particulier dans le cas de données acquises en 3D.

3.2.1 Méthodes d'analyse d'images « classiques »

L'extraction d'informations quantitatives à partir d'images de microscopie peut consister en deux stratégies principales : la détection d'objets et la segmentation. La détection d'objets consiste à la création de boîtes englobant les objets d'intérêts, permettant le dénombrement ou la classification de chaque observation dans une image. La segmentation, elle, consiste à réaliser une individualisation de structures d'intérêts par l'identification des pixels appartenant à ces structures. Les objets quantifiables, représentés par un groupe de pixels, sont alors assignés à une valeur unique, ou label, qui permettra l'identification précise d'un objet donné et l'application de différentes mesures de forme, de taille ou de position dans l'image. La segmentation est une méthode particulièrement efficace pour l'extraction d'informations sur la structure et l'organisation d'un tissu, et différentes méthodes ont été développées pour s'adapter à des types variés d'images et leurs problématiques propres. Elle peut être basée sur la distinction des différences de niveaux de gris des pixels (méthodes de seuillage, « edges segmentation ») ou par la détection de régions de pixels ayant des propriétés similaires grâce, par exemple, à la propagation d'une zone

prédéfinie (« region segmentation », « active contours ») (Kumar, Kumar, et Reddy 2014; Kass, Witkin, et Terzopoulos 1988; Deriche 1987).

Dans le cas d'images de microscopie à fluorescence, en 2D ou 3D, un seuil appliqué sur l'intensité de fluorescence permet la simplification de l'image biologique en image binaire et la distinction du « fond » de l'image et des « objets » d'intérêts. Cependant, les cellules d'un tissu ou cultivées *in vitro* peuvent avoir des bords mal délimités, juxtaposés ou superposés (2D), ce qui nécessite d'adapter une méthode de séparation des objets binaires avant la labellisation, ou une correction après segmentation. Des améliorations d'images au préalable (contrastes, bruit) ou des opérations morphologiques appliquées sur l'image binaire peuvent faciliter la séparation des cellules. L'automatisation de telles étapes est toutefois difficile à obtenir à cause de la variabilité de taille des cellules, d'intensité de marquage et d'irrégularités de structures. Ces difficultés sont d'autant plus vraies dans le cas d'images tridimensionnelles où la complexité de l'image est supérieure et les irrégularités de marquages fluorescents plus fréquentes. Malgré cela, la segmentation classique peut donner des résultats satisfaisants, moyennant suffisamment d'adaptation aux particularités de l'image, l'utilisation de séquences de transformations d'images et des interventions manuelles intermédiaires. Elle reste toutefois particulièrement laborieuse sur des images sous-optimales, tridimensionnelles ou présentant des cellules compactées, et reste souvent peu reproductible à différents échantillons.

3.2.2 *Méthodes modernes d'analyse par intelligence artificielle*

Comme mentionné précédemment, la principale limitation pour l'analyse des images biologiques est représentée par l'étape de segmentation, en particulier pour les images 3D qui présentent un signal fluorescent souvent irrégulier. Il peut s'y ajouter une autre limite non négligeable : le volume des données images 3D qui peut atteindre plusieurs dizaines de Giga-octets, dépassant rapidement les limites de la mémoire RAM. Mais depuis l'avènement récent de l'intelligence artificielle (IA) et le développement d'ordinateurs puissants, ces difficultés semblent aujourd'hui largement dépassées.

L'IA est un concept relativement ancien, avec une apparition des premiers modèles mathématiques pour la création de réseaux de neurones dès les années 40 (McCulloch et Pitts 1943). Elle s'est développée ensuite dans de nombreux domaines mais a mis du temps à se faire une place dans celui des images numériques et biologiques. C'est finalement grâce au développement de cartes graphiques performantes (Graphics Processing Unit), que l'utilisation de l'IA en analyse d'image a connu un essor important et constitue désormais un outil réellement performant et attirant pour l'analyse d'images en biologie, comme l'atteste le déluge récent de publications dans ce domaine. Différents algorithmes basés sur le Deep-Learning (DL) ont en effet émergé, fournissant des applications en microscopie qui permettent notamment de dépasser certaines limitations de la segmentation classique. Ils permettent d'augmenter la précision de la reconnaissance des objets, la reproductibilité de la segmentation et permettent de gagner un temps considérable pour l'analyse de grands ensembles de données en limitant les interventions manuelles des utilisateurs (Moen et al. 2019). Des méthodes ont également déjà été proposées pour

segmenter automatiquement les follicules des tissus ovariens de mammifères à partir d'images histologiques 2D en utilisant un réseau de neurones convolutif (CNN) (Ínik et al. 2019; Sonigo et al. 2018).

Pour démocratiser l'utilisation de la technologie DL, plusieurs initiatives ont récemment vu le jour en fournissant des algorithmes ou des modèles entraînés accessibles à partir de bases de données publiques (<https://bioimage.io/#/>), des notebooks pour faciliter leur accessibilité depuis n'importe quel ordinateur (von Chamier et al., 2021), ou bien encore d'autres plugins open-source comme CSBDeep (Weigert et al., 2018) ou deepimageJ (Gómez-de-Mariscal et al., 2021) pour une utilisation simplifiée avec peu de prérequis en codage informatique. Parmi les modèles disponibles, Cellpose est le seul logiciel disponible à ce jour capable de segmenter des cellules sans nécessiter d'entraînement préalable du modèle (Stringer et al. 2021). Cellpose fournit un modèle généraliste polyvalent pour la détection de divers types de cellules colorées avec différents colorants, et s'est récemment révélé très efficace pour segmenter les fibres musculaires à partir d'images 2D de coupes histologiques (Waisman et al. 2021). Noise2Void (N2V) est une autre approche qui se distingue par ses performances de débruitage d'images. N2V ne nécessite pas de doublons d'images bruitées/débruitées, permettant ainsi un entraînement directement sur le corpus de données à débruiter (Krull, Buchholz, et Jug 2019). À l'ère du deep learning, il semble donc que certaines des limitations de routine pour l'analyse des images biologiques soient désormais résolues. Il ne reste plus aux biologistes que la tâche délicate d'intégrer les étapes d'apprentissage profond dans les différentes procédures d'analyse des images 2D et 3D.

OBJECTIFS

L'objectif de cette thèse est double. Il s'agit dans un premier temps de fournir une description exhaustive de la dynamique de l'ovogenèse au cours du cycle de vie de la femelle médaka *Oryzias latipes* afin de mieux comprendre le phénomène de mise en place, de remodelage intense et continu de l'ovaire, en lien avec l'acquisition et le maintien de la fécondité de cette espèce. Dans ce but, j'ai d'abord cherché à développer une méthode moderne permettant d'explorer le contenu ovarien de manière précise et exhaustive afin d'en extraire des informations quantitatives fiables. J'ai ainsi développé une nouvelle approche d'analyse utilisant des méthodes d'imagerie 3D sur ovaires entiers une stratégie d'analyse d'image permettant d'obtenir des données quantitatives reproductibles à partir d'images 3D complexes.

Dans un deuxième temps, l'objectif de cette thèse est de mieux comprendre comment cette dynamique est régulée tout au long du cycle de vie des femelles, en particulier par le miR-202. J'ai donc poursuivi au cours de ma thèse l'exploration du phénotype de la lignée *miR-202*^{-/-} générée par Gay *et al.* afin d'identifier avec précision les étapes impliquant une régulation par *miR-202*. Dans ce but, j'ai utilisé les méthodes d'analyse 3D du contenu ovarien développées dans cette thèse pour réaliser une analyse fine de la dynamique globale de croissance au sein des ovaires mutants *miR-202*^{-/-} au cours du temps. Outre l'intérêt pour la compréhension de la régulation de la dynamique ovarienne, ce phénotypage fin constitue une première étape vers l'identification des voies de signalisation potentiellement régulées par miR-202 et permettra de guider les recherches vers une ou plusieurs cibles de miR-202 phénotypiquement pertinentes.

Les résultats seront présentés de la façon suivante :

Le chapitre 1 présente les nouvelles méthodologies développées au cours de cette thèse pour l'analyse du contenu ovarien complet en 3 Dimensions. Ce chapitre présentera deux parties sous forme d'articles publiés ou en cours de publication.

Le chapitre 2 présente de nouvelles données de compréhension de la dynamique de l'ovogenèse chez le médaka ainsi que de sa régulation par le miR-202. Elle est divisée en deux parties, présentant d'abord les résultats d'analyse des ovaires au cours du développement et de la reproduction en conditions physiologiques normales, puis l'analyse des dérégulations ovariennes liées à la perturbation de la fécondité chez la lignée *miR-202*-KO.

RESULTATS

Chapitre I

Développement de nouvelles méthodes d'analyse 3D pour l'exploration du contenu de l'ovaire entier

Résumé de chapitre

L'étude des mécanismes de développement et de remodelage des tissus par des méthodes à l'échelle tissulaire, cellulaire ou moléculaire a permis, dans de nombreux cas, d'élucider l'organisation morphologique, structurelle ou fonctionnelle impliquées dans diverses fonctions biologiques. Dans l'ovaire, un grand nombre de processus impliqués dans la formation des ovocytes, des follicules ou la différenciation cellulaire ont ainsi été largement documentés, y compris chez les poissons. Cependant, l'ovogenèse a été peu décrite dans un contexte tissulaire global représenté par l'ovaire et impacte notre compréhension de sa régulation dans un contexte physiologique *in vivo*. Il est en particulier difficile d'évaluer les aspects dynamiques de la croissance folliculaire, qui sont pourtant régulièrement utilisés comme base pour la caractérisation de la fécondité chez les poissons téléostéens. Depuis plusieurs dizaines d'années, les développements de nouvelles technologies de microscopie et de préparation d'échantillons ont suscité un intérêt croissant dans divers domaines de la biologie et ont permis d'importantes innovations comme l'imagerie d'organes ou d'organismes entiers en 3D tout en conservant une résolution cellulaire. De telles méthodologies ont récemment été développées pour les tissus ovariens notamment chez certaines espèces de mammifères, afin d'imager, reconstruire et parfois analyser des ovaires en 3D. Chez les poissons téléostéens, les tissus ovariens sont encore aujourd'hui essentiellement analysés par des méthodes d'histologie sur coupes (2D) ou après dissociation des tissus, limitant la plupart du temps la réalisation d'analyses quantitatives.

Au cours de mes travaux de thèse, un objectif majeur a été de mieux caractériser la dynamique ovarienne chez le médaka *Oryzias latipes*. Afin d'apporter des éléments de compréhension de la croissance folliculaire dans son contexte global, nous avons d'abord cherché à développer des méthodes modernes de microscopie confocale 3D permettant d'accéder au contenu total de l'ovaire à différents stades de développement et des temps variés au cours d'un cycle de ponte. De plus, nous avons mis au point une méthode d'analyse permettant d'extraire des données quantitatives de ces images complexes d'ovaires entiers. La méthode d'analyse, d'abord semi-automatique et présentant différentes limites d'utilisation, a ensuite dans un second temps été améliorée par l'utilisation d'algorithmes d'intelligence artificielle (deep-learning). Ainsi, nous avons développé, pour la première fois, une méthode de bout en bout permettant l'analyse quantitative exhaustive de l'ovaire de poisson, et ceci de manière relativement accessible pour les biologistes non spécialistes de la programmation d'algorithmes.

Ces travaux ont abouti à la publication d'un article dans la revue *Biology of Reproduction*, et d'un article en cours de révision dans la revue *Development*, et sont présentés dans ce chapitre. Ils ont permis, *in fine*, une analyse précise du contenu total de l'ovaire à des âges variés couvrant une grande partie du cycle de vie du médaka.

Article 1 : C-ECi: a CUBIC-ECi combined clearing method for three-dimensional follicular content analysis in the fish ovary†

Manon Lesage^{1,‡}, Manon Thomas^{1,‡}, Jérôme Bugeon¹, Adèle Branthonne¹, Stéphanie Gay¹, Emilie Cardona¹, Marie Haghebaert^{1,2}, Fabrice Mahé², Julien Bobe¹ and Violette Thermes^{1,*}

1 INRAE, LPGP, Rennes, France and 2Université de Rennes, CNRS, IRMAR - UMR 6625, Rennes, France

* Correspondence: INRAE, Laboratoire de Physiologie et Génomique des poissons, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France. E-mail: violette.thermes@inrae.fr

Résumé

L'imagerie en 3 Dimensions (3D) des tissus biologiques ou d'organes entiers a connu d'importantes avancées ces dernières années, permettant notamment l'utilisation de marqueurs fluorescents et la reconstruction d'organes présentant naturellement des caractéristiques physiques (taille, opacité) qui étaient autrefois limitantes en microscopie. Bien que de nombreuses techniques ait été développées pour la transparence d'échantillons épais, aucune n'a été utilisée sur des ovaires de poissons afin de rendre accessible leur imagerie par microscopie 3D. De plus, le succès de méthodes déjà existantes appliquées à d'autres tissus s'avère limité en raison de la haute teneur en lipides caractéristiques des espèces ovipares comme les poissons téléostéens. Dans cet article, nous avons cherché à développer une méthode de transparence efficace pour les ovaires de médaka *Oryzias latipes* et de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* permettant l'imagerie en profondeur par microscopie confocale à fluorescence et la détection des follicules ovariens.

Une méthode de perméabilisation et de transparence efficace a été développée en combinant deux méthodes de transparence des tissus existants dans la littérature : l'utilisation de l'éthyl-cinnamate (ECi), un solvant non toxique, a permis une transparence efficace des ovaires de médaka comme l'a montré la capacité d'imagerie à plus de 2 mm de profondeur en microscopie confocale. La qualité d'imagerie, en particulier la spécificité du marquage fluorescent, a été améliorée par l'utilisation combinée d'une de la méthode d'hyperhydratation des tissus nommée CUBIC (Clear Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational). Notre méthode, dénommée CUBIC-ECi (C-ECi) a ainsi permis, en utilisant un marqueur fluorescent nucléaire, d'imager en 3D l'ovaire entier de médaka et une large portion d'ovaire de truite. Le marqueur nucléaire utilisé, le méthyl-green, a été particulièrement adapté pour délimiter les structures folliculaires des ovaires en raison d'une couche de cellules folliculaires relativement fine chez les téléostéens, mais assez dense en cellules pour reproduire une délimitation continue de chaque follicule. Grâce à

cette délimitation, les images ont pu être analysées par un algorithme semi-automatique mis au point pour réaliser la segmentation des images 3D. La segmentation a permis l'extraction de données quantitatives telles que le nombre de follicules et leur taille respectives, la visualisation de la distribution spatiale des follicules selon leur taille et l'analyse de l'abondance de follicules par classes de tailles. Les résultats ont également montré l'avantage d'une analyse 3D en comparaison à une analyse effectuée en 2 dimensions pour l'interprétation des mesures quantitatives extraites.

En conclusion, les résultats présentés dans cet article constituent la première démonstration d'efficacité de techniques de transparence et d'imagerie 3D en profondeur sur des ovaires de poissons. Bien que la segmentation 3D des images ait permis une analyse exhaustive de ces images, cette étape gagnerait à être améliorée en termes d'automatisation, de précision de segmentation ayant notamment un impact sur la reproductibilité d'analyse.

Research Article

C-ECi: a CUBIC-ECi combined clearing method for three-dimensional follicular content analysis in the fish ovary[†]

Manon Lesage^{1,‡}, Manon Thomas^{1,‡}, Jérôme Bugeon¹,
Adèle Branthonne¹, Stéphanie Gay¹, Emilie Cardona¹,
Marie Haghebaert^{1,2}, Fabrice Mahé², Julien Bobe¹ and
Violette Thermes^{1,*}

¹INRAE, LPGP, Rennes, France and ²Université de Rennes, CNRS, IRMAR - UMR 6625, Rennes, France

***Correspondence:** INRAE, Laboratoire de Physiologie et Génomique des poissons, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France. E-mail: violette.thermes@inrae.fr

[†]**Grant Support:** This work was supported by the TEFOR project (Agence National de la Recherche, ANR-II-INBS-0014) and the DYNAMO project (Agence National de la Recherche, ANR-18-CE20-0004).

[‡]These authors contributed equally to this work.

Received 11 March 2020; Editorial Decision 5 August 2020; Accepted 7 August 2020

Abstract

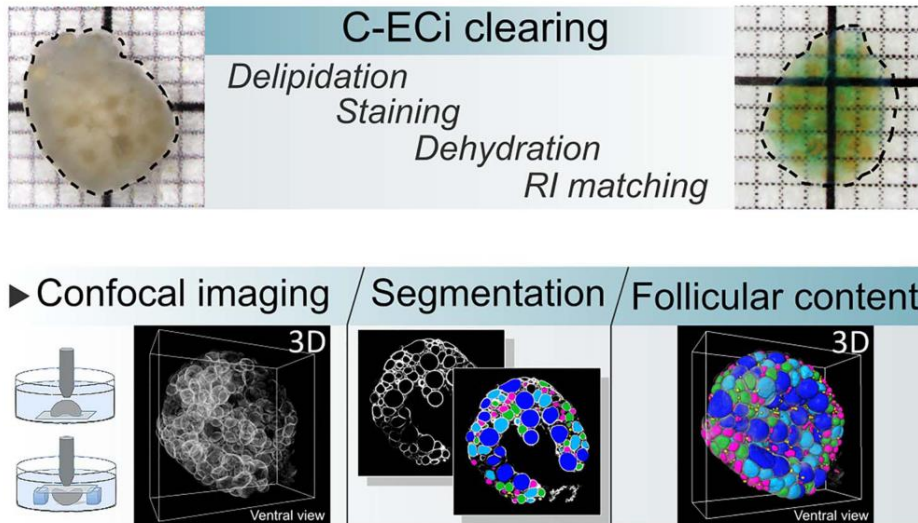
Deciphering mechanisms of oocyte development in the fish ovary still remain challenging, and a comprehensive overview of this process at the level of the organ is still needed. The recent development of optical tissue clearing methods has tremendously boosted the three-dimensional (3D) imaging of large size biological samples that are naturally opaque. However, no attempt of clearing on fish ovary that accumulates extremely high concentration of lipids within oocytes has been reported to date. To face with this ovarian-specific challenge, we combined two existing clearing methods, the nontoxic solvent-based ethyl cinnamate (ECi) method for efficient clearing and the Clear Unobstructed Brain *Imaging* Cocktails and Computational (CUBIC) method to enhance lipid removal and reduce nonspecific staining. The methyl green fluorescent dye was used to stain nuclei and delineate the follicular structures that include oocytes. Using this procedure (named CUBIC-ECi [C-ECi]), ovaries of both medaka and trout could be imaged in 3D and follicles analyzed. To our knowledge, this is the first procedure elaborated for clearing and imaging fish ovary in 3D. The C-ECi method thus provides an interesting tool for getting precise quantitative data on follicular content in fish ovary and promises to be useful for further developmental and morphological studies.

Summary Sentence

A modified ethylcinnamate-based clearing method allowing 3D imaging of fish ovary and analyzing follicular content.

Graphical Abstract

CUBIC-ECi (C-ECi) clearing for 3D quantitative analysis of the medaka ovarian content



Key words: medaka, trout, ovary, ethyl-cinnamate, confocal microscopy, 3D segmentation.

Introduction

Although much effort has been made in recent years toward understanding oogenesis mechanisms at a cellular level in fish, we still lack a comprehensive overview of this dynamic process at the level of the organ. Tightly regulated networks of hormones, secreted factors, and intrinsic signaling pathways underlie the progression of each single oocyte throughout oogenesis and control the female fecundity [1–3]. In terms of timing, it however exist different dynamics of oogenesis in adult females, in relation with the different reproductive strategies that exist in fish [4]. So far, studies related to oogenesis dynamics in fish have mainly been based on follicular (i.e., oocytes and their surrounding somatic supporting cells) content analyses from ovarian 2D histological sections, which require extensive extrapolations of data [5]. Three-dimensional (3D) analyses of ovarian follicular contents would thus be a major milestone on the path toward a better comprehension of the oogenesis temporal dynamics in fish.

Techniques for 3D imaging of large biological samples that are naturally opaque have experienced major technical breakthroughs this past decade, including the development of numerous optical clearing methods to enhance tissue transparency and reduce light scattering [6]. These methods are either aqueous- or organic solvent-based methods and are grouped into four main classes, including the simple immersion methods, hyperhydrating methods, solvent-based methods, and tissue transformation methods [6, 7]. Simple immersion methods rely on the homogenization of refractive indexes of medium and tissues by using high-refractive index (hRI) aqueous solutions. These solutions are composed of the contrast agent iohexol (also called Histodenz), such as for the RI Matching Solutions (RIMS) or are sugar-based methods, such as for SeeDeepBrain (SeeDB) [8–10]. Methods of the second class are hyperhydrating

solutions, such as the CUBIC analysis that is based on the use of the hyperhydrating aminoalcohols, urea, and removal of lipids with detergent [11]. Methods of the third class are tissue transformation methods, such as the emblematic PActive CLARITY Technique (PACT) that uses a hydrogel to stabilize the tissue structure while removing lipids with detergent [8]. In the fourth class, the 3D Imaging of Solvent-Cleared Organs method (3DISCO) allows to bypass clearing performance limitations of water-based clearing methods, while preserving fluorescence [12]. More recently, Klingberg et al. developed a new clearing method using the organic compound ethyl-3-phenylprop-2-enoate (ethyl cinnamate [ECi]) that is extremely efficient for clearing animal tissues, including mammals [13–15]. ECi is considered nontoxic according to the European directive 67/548/EWG and is a Food and Drug Administration-approved food flavor and additive for cosmetic products [16]. Some of these clearing methods were already used for clearing the whole mouse ovary and allowed successful 3D imaging [17–20]. However, no attempts on fish ovary, which contains large size (up to 1 mm) and lipid rich oocytes, have been reported with any of these clearing methods either in zebrafish, medaka, or any other model fish species.

We tested several of these clearing methods on the medaka ovary. The fluorescent methyl green (MG) nuclear dye was used to delineate ovarian follicles. Our study reports that combining the CUBIC and ECi clearing methods allows solving the fish ovarian-specific challenges and optimizing the 3D fluorescent imaging. With this protocol, named CUBIC-ECi (C-ECi), we used a specific objective compatible with solvents immersion, which allowed high-resolution 3D imaging of ovaries of both medaka and rainbow trout. Such methodology will help evaluating the number of ovarian follicles in the fish ovary and providing new information on regulatory mechanisms that underlies female fecundity.

Materials and methods

Ethical statements

All experimental procedures used in this study followed the recommendations of the French and European regulation on animal welfare. Fish rearing and handling were approved by the INRAE LPGP-Animal Care and Use Committee (N° Z-2015-30-VT and Z-2015-127-VT-MF) for medaka and by the INRAE PEIMA Institutional Animal Care and Use Ethical Committee for rainbow trout (B29-277-02).

Fish breeding and sample collection

Adult medaka (*Oryzias latipes*) females from the CAB strain were raised in the INRAE-LPGP fish facility at 26 °C under an artificial photoperiod (14 h light/10 h dark), during which the length of the reproductive cycle is of 24 h and eggs are daily spawned at the onset of the light. Female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from an autumn-spawning strain were held under natural photoperiod until their first reproduction (2 years) in INRAE-PEIMA experimental fish facilities (Sizun, France). For ovary dissections, medaka (aged from 4 to 5 months) and trout (2.5 years old, 134 days after the first spawning) fishes were euthanized by immersion in a lethal dose of MS-222 solution at 30–50 and 400 mg/L, respectively. Ovary of both medaka and trout were fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS, Sigma-Aldrich P4417 Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri United-States)). Then, ovaries were washed in PBS and conserved at 4 °C in PBS + 0.5% (w/v) sodium azide (S2002, Sigma-Aldrich).

Optical tissue clearing protocols

A schematic overview of clearing experimental workflows is shown on Figure 1A and 2A.

Simple immersion. All steps were performed at room temperature on an agitator. High-refractive index (hRI) matching solutions were prepared as described in Yang et al. with some modifications [8]. A 60% sorbitol-based solution was prepared by dissolving 300 g of Sorbitol (Sigma-Aldrich S1876) in 400 mL of PBS:DMSO (50:50) (v/v). The RI was adjusted at 1.457 by addition of PBS:DMSO. Dilutions of this solution (1:6 and 11:15) were prepared to reach lower RI (1.353 and 1.40). To reach RI 1.49, 120 g of sorbitol was dissolved in 50 mL of PBS:DMSO. For RI 1.456, 13.32 g of Histodenz (Sigma-Aldrich D2158) was dissolved in 10 mL of PBS 0.02 M (Sigma-Aldrich P4417). For each of the solutions described previously, ovaries were immersed successively in 20% (v/v) for 8 h, 40% (v/v) for 16 h, 60% (v/v) for 8 h, 80% (v/v) for 16 h, and 100% (v/v) for 48 h.

iDISCO+. Protocol was conducted as described by Renier et al. with slight modifications [21]. All steps were performed at room temperature on an agitator except with dibenzyl ether. Samples were dehydrated in a 20–40–60–80–98% (v/v) methanol series containing 2% Tween20 for 12 h each. A final bath in 100% methanol was performed during at least 24 h. Ovaries were incubated successively in 66% dichloromethane (DCM, Sigma-Aldrich 270997)/33% methanol for 3 h and in 100% DCM twice during 15 min. Sample was then immersed at least 15 min in dibenzyl ether (DBE, Sigma-Aldrich 108014) for refractive index matching.

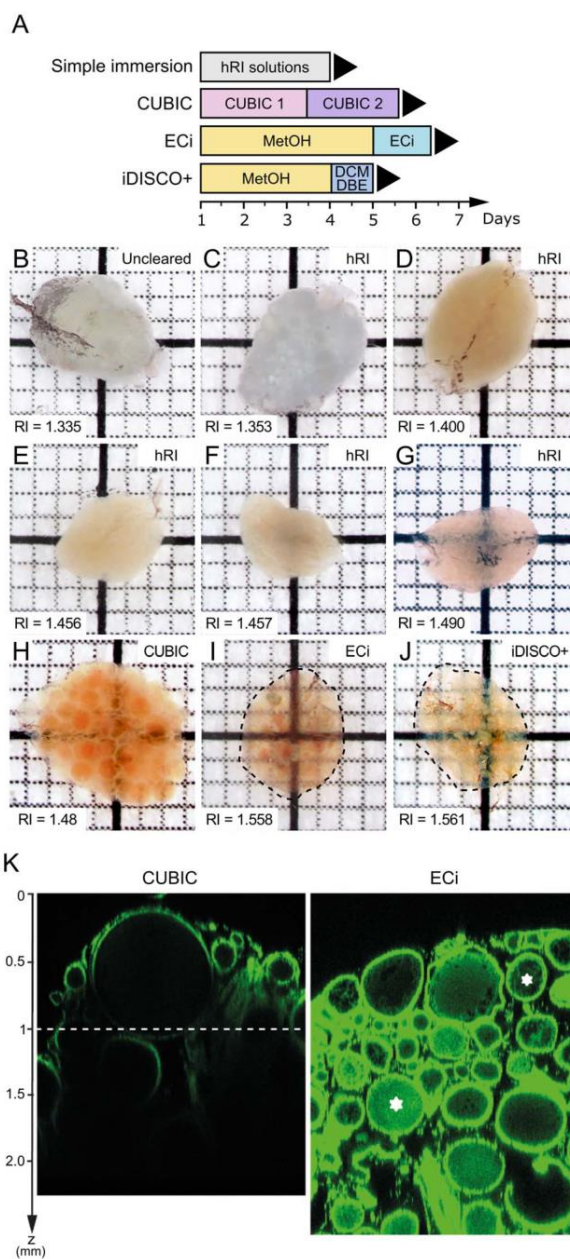


Figure 1. Assessment of the transparency of adult medaka ovaries treated with different clearing methods. Ovaries dissected from adult medaka were cleared with hRI immersion solutions, CUBIC, ECI, or iDISCO+ methods. From one to three samples were used in each condition. (A) A schematic overview of experimental workflows. (B) Uncleared ovary in PBS. (C–G) Ovaries cleared with hRI immersion solutions with increasing refractive index. (H–J) Ovaries cleared with the indicated methods, CUBIC, ECI, or iDISCO+. Transparency was assessed by the visualization of black squares. Dotted black line indicates the edge of ovaries after clearing. The solvent-based clearing methods ECI and iDISCO+ are the most efficient methods for clearing medaka ovary. (K) Comparison of the fluorescent recovery in depth after CUBIC and ECI methods. The maximal signal recovery in depth was obtained with the ECI method although an important intrafollicular background was observed. Square = 1 × 1 mm.

CUBIC. A protocol was conducted as described previously by Suzuki et al. with slight modifications [11]. Ovaries were incubated 3 h in 50% CUBIC-1/50% PBS at room temperature and then

transferred for 3 days in 100% CUBIC-1 at 37 °C on a rotating wheel. CUBIC-1 reagent is composed of 25% (w/w) urea (Sigma-Aldrich GE17-1319-01), 25% (w/w) N,N,N',N'-tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylenediamine (Sigma-Aldrich 122262), and 15% (v/v) tritonX-100 (Sigma-Aldrich X-100) in distilled water. The CUBIC-1 reagent was renewed once after 24 h. Samples were rinsed three times in PBS at room temperature for 1 h and incubated for 2 days in CUBIC-2 reagent at 37 °C on a rotating wheel. CUBIC-2 solution was renewed after 24 h. CUBIC-2 is composed of 50% (w/w) sucrose (Sigma-Aldrich S9378), 25% (w/w) urea (Sigma-Aldrich GE17-1319-01), 10% (w/w) triethanolamine (Sigma-Aldrich 90279), and 0.1% (v/v) TritonX-100 in distilled water.

Ethyl cinnamate. ECi clearing was adapted from Klingberg et al. with few modifications [13]. All steps were performed at room temperature on an agitator. Samples were dehydrated in a dilution series of 20–40–60–80–98% (v/v) methanol/2% Tween20 for about 12 h each. Samples were then successively immersed in 100% methanol during 48 h and in 100% ECi for 3 h (without shaking). ECi solution was renewed and samples were placed on an agitator until complete clearing (i.e., from 24 h to several days).

CUBIC-ECi. Ovaries were successively incubated in 50% CUBIC-1/50% PBS for 3 h at room temperature and in 100% CUBIC-1 for 3 days at 37 °C on a rotating wheel, as for the CUBIC protocol. The CUBIC-1 reagent was renewed after 24 h. Then, samples were rinsed three times in PBS at room temperature for 1 h and processed according to the ECi protocol.

Nuclear staining with methyl green

Nuclear staining was performed before clearing steps in the ECi protocol and after CUBIC-1 in the CUBIC and C-ECi protocols (Figure 1A and 2A). Samples were incubated in MG in PBS/0.1% triton (pH 7) or in TNT (TrisHCl 0.1 M, NaCl 0.15 M)/0.1% triton (pH 4). MG was used at 80 or 8 µg/mL. Incubations were performed at 4 or 50 °C for 2.5 days. Samples were then washed overnight in PBS + 0.1% tween at room temperature.

Image acquisition

Bright-field macroscopic images were acquired with an upright Zeiss stereomicroscope with an AxioCam digital camera. Image post-processing (enhancement of brightness and contrast) was applied when necessary to homogenize the image background. Sample fluorescence imaging was performed with a Leica TCS SP8 laser scanning confocal microscope, using the 16x/0.6 IMM CORR VISIR HC FLUOTAR objective (ref. 15506533, Leica (Wetzlar, Germany)) dedicated to immersion acquisition mode within the Benzyl Alcohol/Benzyl Benzoate solvent-based solution. The MG fluorescent signal was detected through laser excitation at 638 nm, and fluorescent detection was performed by an internal photomultiplier. For clearing method comparisons, samples were imaged with the same settings, including no laser compensation in depth and no image post-processing. For 3D segmentation, whole samples were imaged with laser compensation and contrast enhancement was applied. Tiles of z-stack images were acquired and stitched into larger mosaics using the microscope software (11.72% overlap). Z-steps were fixed at 6 µm for all acquisitions. For medaka ovaries (about 3 mm thick) and because the working distance of the objective is limited (2.5 mm), dorsal and ventral faces were imaged separately. The overlap was of 1 mm. The ventral face of the ovary was fixed to a coverslip

with epoxy glue (SADER 30610770) and placed in a glass Petri dish containing ECi. For dorsal and ventral face imaging, the coverslip was placed successively with the ovary up or down, respectively. For ventral face imaging, the coverslip was placed on a stainless steel washer as a spacer. A schematic overview of the mounting procedure is shown on Figure 3A. For each z-stack, a total volume of about $8 \times 7 \times 2$ mm was acquired (voxel size: $1.8 \times 1.8 \times 6$ µm) and generated about 5.5 GB of data. Acquisition of z-stack images took approximately 10 h for each face of medaka ovaries and 4 h for the trout ovary portion. All samples were imaged within the following week after staining and clearing.

Three-dimensional volume reconstruction and segmentation

Whole specimen image stacks acquired by confocal microscopy were treated with the Amira 2019.2 software Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, United States) on a 64-bit Windows 10 Pro computer equipped with a 2x Intel Xeon Silver 4110 (8 Core, 3.0GHz) processor, a Nvidia Geforce GTX 1080 graphic card and 384 Go of RAM. For medaka ovaries, Z-stacks of each face (ventral and dorsal) were stitched manually and merged by standard interpolation with the Amira software. To minimize the size of data, images were scaled to 0.3 (1:3) in X and Y. 3D follicle segmentation was performed semi-automatically in the project editor of Amira using a combination of different operation with systematic 3D interpretation. To binarize the nuclear signal, the image gradient (Canny–Deriche) was calculated and a Top-Hat was applied on resulting images to threshold nuclei. Images were inverted to visualize the internal part of follicles and connective tissues. Morphological operator like opening and hole filling was performed to improve follicles shapes. A watershed was applied to separate connected objects. To eliminate nonfollicles remaining structures, binary objects were filtered based on their size and shape. Only follicles with a spherical shape and an equivalent diameter above 50 µm were kept. Resulting 3D reconstruction of follicles was generated with Amira's "Volume rendering" visualization module. Volumes of all segmented follicles were exported and equivalent diameters were calculated and corrected with the correction factor to compensate the volume shrinkage due to sample clearing. For 2D segmentation analysis, equivalent diameters were extracted from each image plane. For 3D volume reconstructions, follicles were colorized by diameter range, based on their corrected size.

Statistics

Statistical analyses were performed by using RStudio Version 1.1.463. P-values were calculated by using a Mann–Whitney test or a nonparametric Wilcoxon signed-rank test for indicating significant differences between samples.

Results and discussion

The solvent-based ECi method efficiently clears the medaka ovary

We first assessed the clearing efficiency on medaka ovary of various hRI simple immersion solutions, of the hyperhydrating CUBIC method and of solvent-based methods such as ECi or iDISCO+ (Figure 1A). For hRI simple immersion, samples were treated with hRI matching solutions adjusted to increasing refractive index, from 1.353 to 1.49. The apparent transparency in each condition was compared to that of an opaque uncleared ovary. With the different

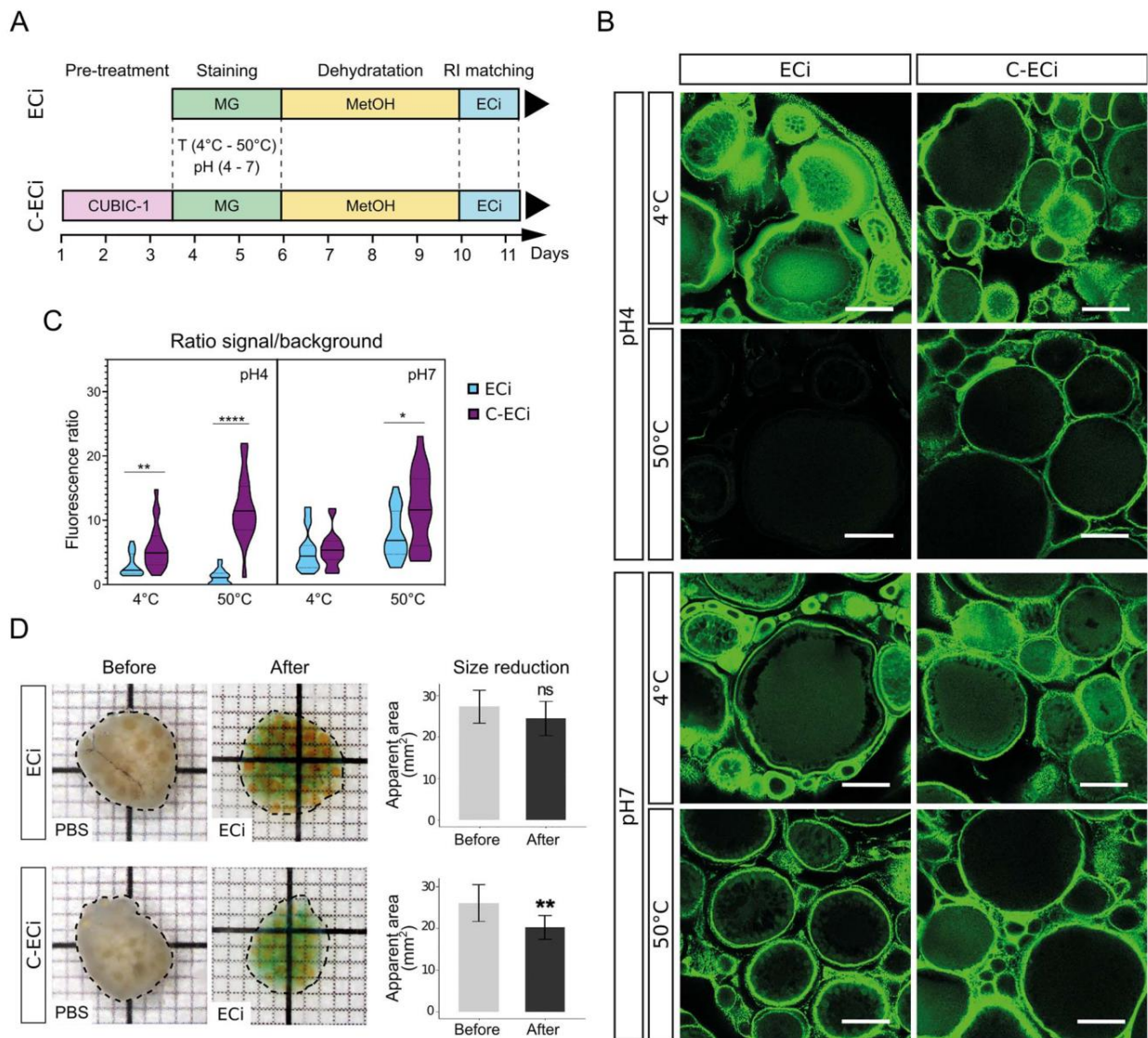


Figure 2. Combining CUBIC and ECI methods efficiently improve follicular staining in the whole medaka ovary. Medaka ovaries were cleared following the ECI procedure with or without a pretreatment with the aqueous reagent 1 of the CUBIC method (C-ECi or ECI, respectively). The outlines of follicles were detected with the fluorescent MG nuclear dye using different conditions of pH and temperature. (A) Clearing protocols timelines. (B) Representative images of the MG fluorescent signal (in green) on XY-planes at 1000 μm depth acquired with the same settings and from ovaries treated with ECI or C-ECi. Three samples were used in each condition. Tissue integrity and intracytoplasmic background are improved when samples are treated with C-ECi and when incubated at 50 $^{\circ}\text{C}$ for MG staining. (C) Quantification of the signal contrast obtained with MG staining. The ratio signal/background was measured in different regions of interest (ROI) on sections. Violin plots are displayed on graph for ECI (in blue) and C-ECi (in purple) treated samples with variations in the different conditions of temperature and pH. The ends of the boxes define smallest and highest values. The line indicates the median and the dashed lines the 25th and 75th percentiles (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$, Mann-Whitney test, $n = 20$). (D) The apparent ovarian surface areas were measured from brightfield images (black dotted lines) before and after clearing with ECI ($n = 7$) and C-ECi ($n = 12$). The tissue shrinkage is significant after C-ECi clearing (Wilcoxon test, $P = 0.002516$). Data are presented as means \pm SD. Square = 1 \times 1 mm; scale bars: 250 μm .

hRI solutions, samples displayed only a tiny increase of transparency that was maximal at RI 1.49 (Figure 1B–G). When treated with CUBIC (RI 1.48), transparency was significantly increased (Figure 1B and H). The higher transparency was obtained with the solvent-based ECI (RI 1.558) and iDISCO+ (RI 1.561) methods (Figure 1B, I, and J).

We then assessed the optical penetration in depth of confocal imaging after clearing with either CUBIC or ECI methods. Nuclei,

including those of the theca and granulosa cells lining each oocyte, were stained with the MG far-red fluorescent nuclear dye [22]. Whole samples were imaged by confocal microscopy with no signal compensation in depth and no image postprocessing (Figure 1K). XZ orthoslices of the stacks showed a limited signal recovery in depth with CUBIC (<1 mm), whereas the signal recovery in depth was much higher with ECI (up to 2.5 mm), corresponding to the working distance of the objective. However, we observed a

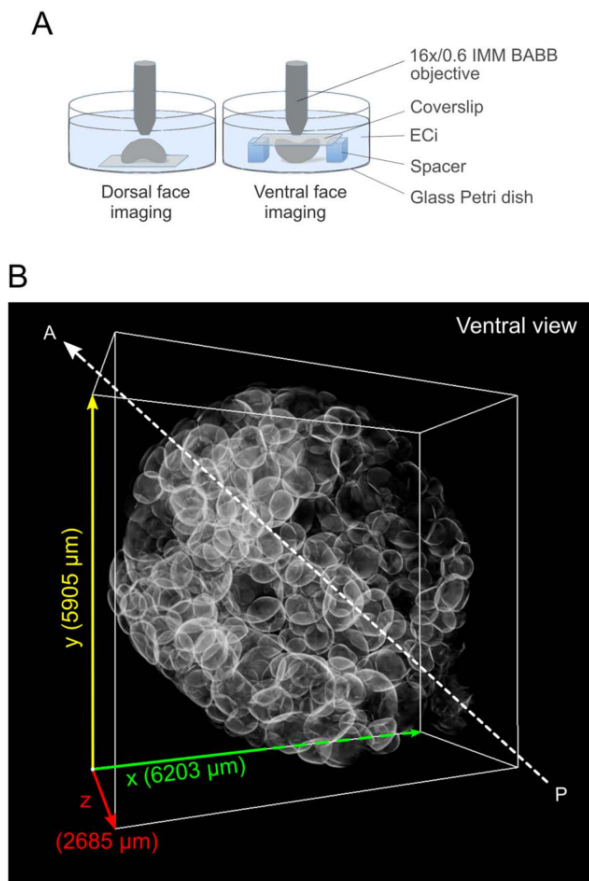


Figure 3. 3D imaging of a C-ECi cleared medaka ovary. (A) Schematic overview of the sample mounting for confocal imaging of medaka ovaries. (B) 3D reconstruction of a whole medaka ovary after MG staining, C-ECi clearing, and confocal imaging. A, anterior side; P, posterior side.

nonspecific intracytoplasmic background in ECI-treated samples, whereas no background was detected in CUBIC-treated samples (Figure 1K, stars). Similar background was observed in ovaries stained with a less concentrated MG solution (8 μg/mL, data not shown).

These results show that, at a macroscopic level, solvent-based methods (such as iDISCO+ or ECI) enable better clearing of medaka ovary than aqueous-based methods (such as simple immersions or CUBIC). Similarly, previous studies in mouse reported the clearing of fetal and adult ovaries with the aqueous-based methods CLARITY [17], ScaleA2 [18], and CUBIC [23], but higher clearing efficiency was obtained with the solvent-based iDISCO+ method [20]. The lipid-content is markedly higher in fish ovary than in mouse ovary, since fish oocytes exhibit higher lipid supply and larger size due to their telolecithal nature. It is thus even more consistent that solvent-based clearing methods, employing the highest RI matching solutions, are more appropriated for clearing fish ovaries than aqueous-based methods. However, we must note that, at a microscopic level, a strong intrafollicular fluorescent background was observed with the ECI method.

Optimization of the ECI method

Based on the assumption that the intrafollicular background was due to remaining lipids in oocytes after ECI treatment, we tested whether

additional lipid removal may improve the staining specificity. Entire ovaries were thus incubated in the aqueous reagent 1 of the CUBIC clearing method (CUBIC-1) prior MG staining and ECI clearing [11]. Furthermore, we tested whether different MG staining conditions may also contribute to reduce the background [24–26]. CUBIC-1 preincubated ovaries (C-ECi protocol) and not preincubated ovaries (ECi native protocol) were thus processed for MG staining at two different temperatures (4 and 50 °C) and pH (pH 4 and pH 7, Figure 2A). XY plans at 1000 μm depth from z-stacks of the different cleared samples were compared (Figure 2B). Follicles of different sizes were easily distinguishable in each condition, except with ECI at 50 °C-pH 4, where almost no fluorescent signal was recovered. Follicles appeared well packed in almost all conditions except at 4 °C-pH 4, where follicles appeared distorted and slightly dissociated. The fluorescence ratio signal/background was significantly increased with the C-ECi protocol and the higher ratio was obtained at 50 °C-pH 7 that offers the best signal contrast (Figure 2C).

To evaluate the effect of C-ECi clearing on the ovarian size, the apparent surface of the ovaries was measured on macroscopic images before and after ECI or C-ECi methods (Figure 2D). Almost no size modification was observed with ECI alone, whereas the apparent ovarian size was significantly reduced after C-ECi treatment (S2), compared to the ovarian size before treatment (S1):

$$S1 = 26,01 \pm 5,54 \text{ mm}^2$$

$$S2 = 20,51 \pm 4,10 \text{ mm}^2.$$

The shrinkage of ovaries treated with C-ECi were therefore of about 21%. We used the apparent ovarian surfaces measured before and after C-Eci treatment (S1 and S2, respectively) in order to calculate a correction factor and estimate the real diameter of follicles. We assumed that the ovarian shrinkage was due to the reduction of follicles size and that the reduction rate was independent of the follicular size, as observed after dehydration of isolated follicles of various sizes [27]. The correction factor (corr) was calculated as follows:

$$\text{corr} = \frac{D1}{D2} = \frac{R1}{R2} = \sqrt{\frac{\pi R_1^2}{\pi R_2^2}} \approx \sqrt{\frac{S1}{S2}} = 1,12.$$

This correction factor was applied to all measured follicular diameters in further analyses.

Here, we showed that combining CUBIC and ECI methods significantly reduces intrafollicular fluorescent background of MG staining in medaka ovary, likely by increasing delipidation of oocytes, and that 50 °C-pH 7 staining conditions significantly improve the staining. In a previous study, McKey et al. successfully used iDISCO for clearing and imaging the mouse ovary [20]. Interestingly, in this latter, a CUBIC treatment was added at the end of the protocol to allow immersion of the objective in an aqueous noncorrosive solution. By contrast, In the C-ECi method, the CUBIC treatment was performed at the beginning of the protocol in order to reduce the MG background, while increasing the clearing efficiency, and image acquisitions were performed by immersion within the ECI, using a dedicated immersion objective that resists to corrosive solvents. Anyhow, we cannot exclude that similar results could also be obtained by using the solvent-based iDISCO method alone, since this later already includes a delipidation step with the organic dichloromethane reagent (DCM) [21, 28]. Although the iDISCO

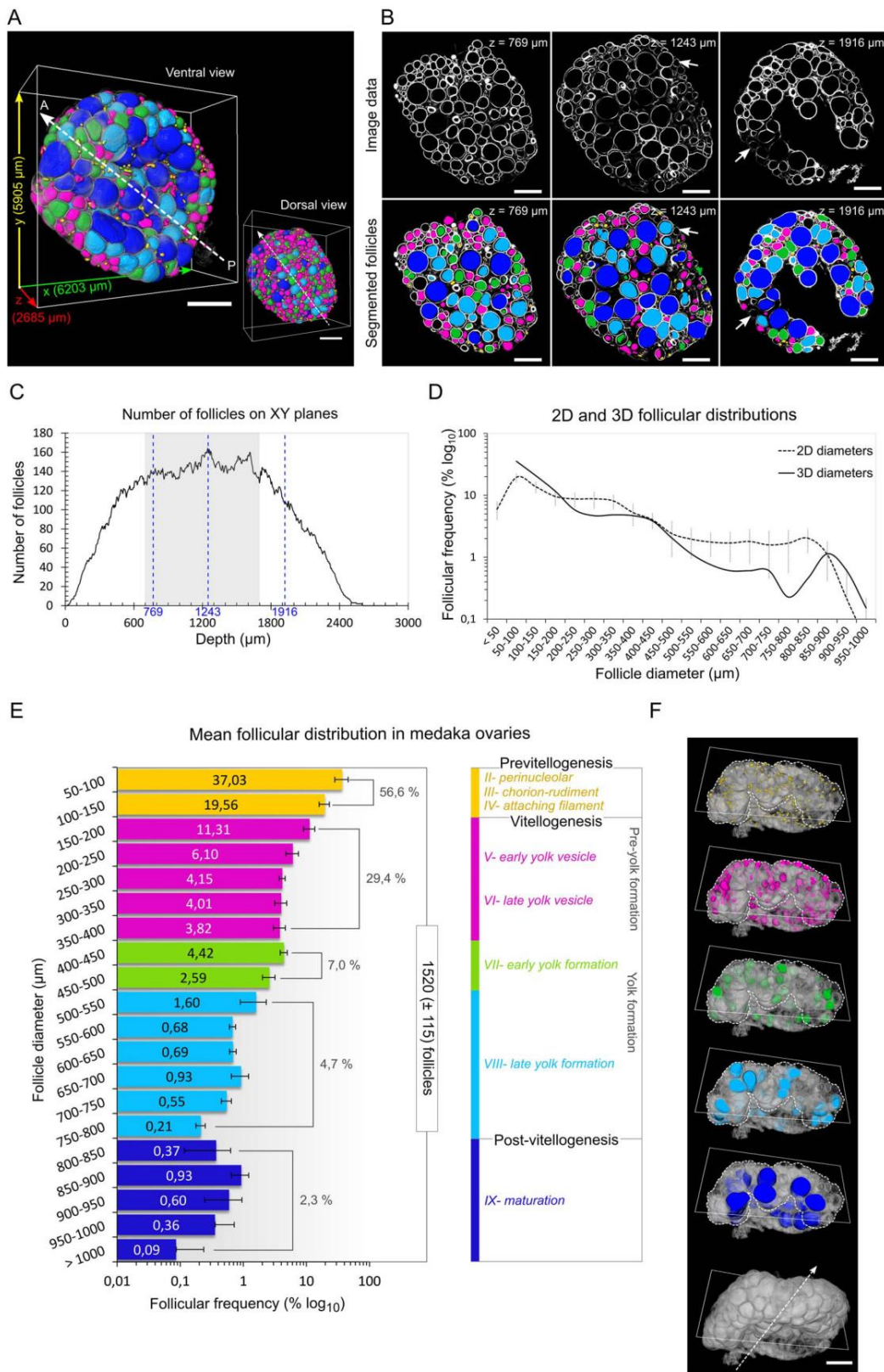


Figure 4. 3D follicular content analysis in the adult medaka ovary. Medaka ovaries were processed through MG staining, C-ECi clearing, 3D imaging, and 3D follicular segmentation. (A) Ventral and dorsal views of a 3D reconstruction of a whole ovary merged with 3D-segmented follicles. (B) XY-planes at increasing depths showing image data (top panels) and image data merged with segmented follicles (bottom panels). Only few follicles were not detected (arrows). (C)

and C-ECi protocols might be equally efficient, the C-ECi protocol remains very advantageous since CUBIC-1 and ECi solutions both have a very low toxicity, by contrast to the iDISCO solutions. The C-ECi method is thus an interesting nontoxic alternative to the iDISCO+ method, which greatly facilitates handling samples though similar results might likely be obtained with the iDISCO+ method.

Furthermore, it is worth noting that the C-ECi method led to sample shrinkage of about 21%. Such sample shrinkage is frequently observed after tissue dehydration or clearing, as with the iDISCO+ clearing method that is known to introduce a significant shrinkage of samples estimated at 11% for the mouse brain [21]. However, a moderate shrinkage may not be considered as a drawback since it may allow easier imaging of large samples such as entire mice [29]. All the more so we demonstrated that it is possible to calculate a correction factor that can be applied to determine the real follicular diameters.

Assessment of 3D imaging and 3D segmentation of a C-ECi cleared medaka ovary

An ovary collected from an adult medaka female was stained with MG at 50 °C-pH 7, cleared with the C-ECi protocol and imaged on both faces (dorsal and ventral) by confocal microscopy in immersion mode (Figure 3A). After stitching in Z, the final stack comprised 480 XY-image planes and the whole volume was reconstructed (Figure 3B). All follicles were detectable and no loss of resolution was observed throughout the sample (Supplementary Video S1). The final stack was used for 3D segmentation and analysis of ovarian follicles, using a computational semi-automatic 3D segmentation procedure. Follicles of various sizes were segmented and reconstructed as shown on the 3D views (Figure 4A). Only few follicles were not detected as shown on XY-planes (Figure 4B, arrows). To assess the gain of a 3D analysis of follicles, compared to a 2D analysis, the follicular diameters were extracted from the 3D segmented image data of the whole ovary and compared to those extracted from the corresponding 480 XY-image planes. The correction factor was applied to all diameter values. The number of follicles and the size distribution were analyzed in both cases. We obtained a total of 1323 follicles (ranging from 50 to 963 μm diameter) in the whole ovary, while using 2D-image data the total number of follicles measured on XY-planes ranged from 1 to 164, with an average of 144 follicles on planes between 700 and 1700 μm depth (representing a total of 167 XY-planes, Figure 4C). These later were used to calculate the mean size distribution on XY-planes, which was compared to that obtained with the 3D-segmentation data (Figure 4D). In the 2D analysis, the mean numbers of small (<200 μm) and large (>900 μm) follicles were lower, whereas the mean numbers of intermediate follicles were higher (dotted line), as compared to the 3D analysis (continuous line). In addition, 2D diameters <50 μm could be measured, although the 3D segmentation process was restrained to

follicles above 50 μm in diameter. Altogether these data reveal the important bias introduced by the 2D analysis.

Using the C-ECi method and a confocal microscope with a dedicated objective, we successfully attempted to image a whole medaka ovary (about 2.5 mm thick) at a cellular resolution. This was also facilitated by the use of the MG, a far-red and highly light-stable fluorescent dye. Then, we proceeded to a semi-automatic 3D segmentation of follicles and we demonstrated that such a 3D analysis of the follicular content in the medaka ovary is much more relevant than a 2D analysis that introduces significant bias in the results.

Three-dimensional follicular distribution in the medaka ovary

Three ovaries were processed as previously described through the MG staining and C-ECi clearing followed by 3D imaging, 3D segmentation and follicular diameter measurements. The mean size distribution of follicles, ranging from 56 to 1033 μm diameter, was obtained (Figure 4E). The developmental stage of follicles was determined according to their diameter and as described in the oocyte developmental table of Iwamatsu et al. [27]: 50–150 μm diameters (stage of previtellogenesis, stages II–IV, in yellow); 150–400 μm diameters (stage of pre-yolk formation, stages V and VI, in magenta), 400–500 μm diameters (early-yolk formation stage, stage VII, in green), 500–800 μm diameters (late-yolk formation stage, stage VIII, in light blue), and >800 μm diameters (maturation stage, stage IX, in dark blue). The mean follicular size distribution displays a predominance of small previtellogenic follicles (56.6%, in yellow) and pre-yolk formation follicles (29.4%, in magenta). Representative 3D views of follicles at the different stages indicated that the large maturing follicles (in dark blue) were preferentially located on the ventral side of the ovary, whereas no evident spatial arrangement could be observed for the other categories (Figure 4F).

C-ECi clearing, 3D imaging, and 3D segmentation of the trout ovary

The C-ECi clearing, 3D imaging, and 3D segmentation procedures were tested, as a proof of concept, on the rainbow trout ovary that has much larger ovaries and oocytes (up to 4–5 mm) than the medaka ovary. Pieces of trout ovary (about 8 × 6 × 2 mm) collected from an adult female fish were processed through the C-ECi protocol and MG staining. Opacity was sufficiently reduced to see through the samples (Figure 5A). A sample was used for 3D imaging by confocal microscopy (Figure 5B), and the whole volume was reconstructed in 3D (Figure 5C). No major loss of resolution was observed on XY-planes at increasing depths (Figure 5D, left panels and Supplementary Video S2). Follicles were segmented from the 3D image data using a computational semi-automatic 3D segmentation procedure. Few follicles could not be segmented (Figure 5D, right panels, arrows). The resulting 3D surface reconstruction of follicles

Figure 4. (continued) Number of follicles detected on XY-planes. The gray area delineates XY-planes between 700 and 1700 μm depth (167 planes in total). (D) Comparison of 2D and 3D follicular diameter distributions. The dotted line represents the diameters distribution of follicles on XY-planes between 700 and 1700 μm depth (2D diameters). The continuous line represents the diameters distribution of follicles in the whole ovary (3D diameters). (E) Mean distribution of the 3D follicular diameters in adult ovaries. The 3D follicular segmentation resulted in a total of 1520 ± 115 follicles (mean \pm SD, $n = 3$). The corresponding developmental stages are indicated with different colors: previtellogenesis (in yellow), pre-yolk formation (in magenta), early-yolk formation (in green), late-yolk formation (in light blue), and maturation (in dark blue). (F) Transversal clipping planes of 3D reconstructions of follicles at the different stages. The 3D volume reconstruction of the whole ovary is displayed on bottom panel. The large maturing follicles (in dark blue) are preferentially located on the ventral side of the ovary. Frequencies are percentages of the total number of segmented follicles (D, E). Mean values (\pm SD) are displayed on graphs for the 2D diameters distribution on XY-planes ($n = 167$, D) and for the 3D diameters distribution in the whole ovary ($n = 3$, E). The white dotted lines delineate the border of the ovary. A, anterior side; P, posterior side. Scale bars: 1 mm.

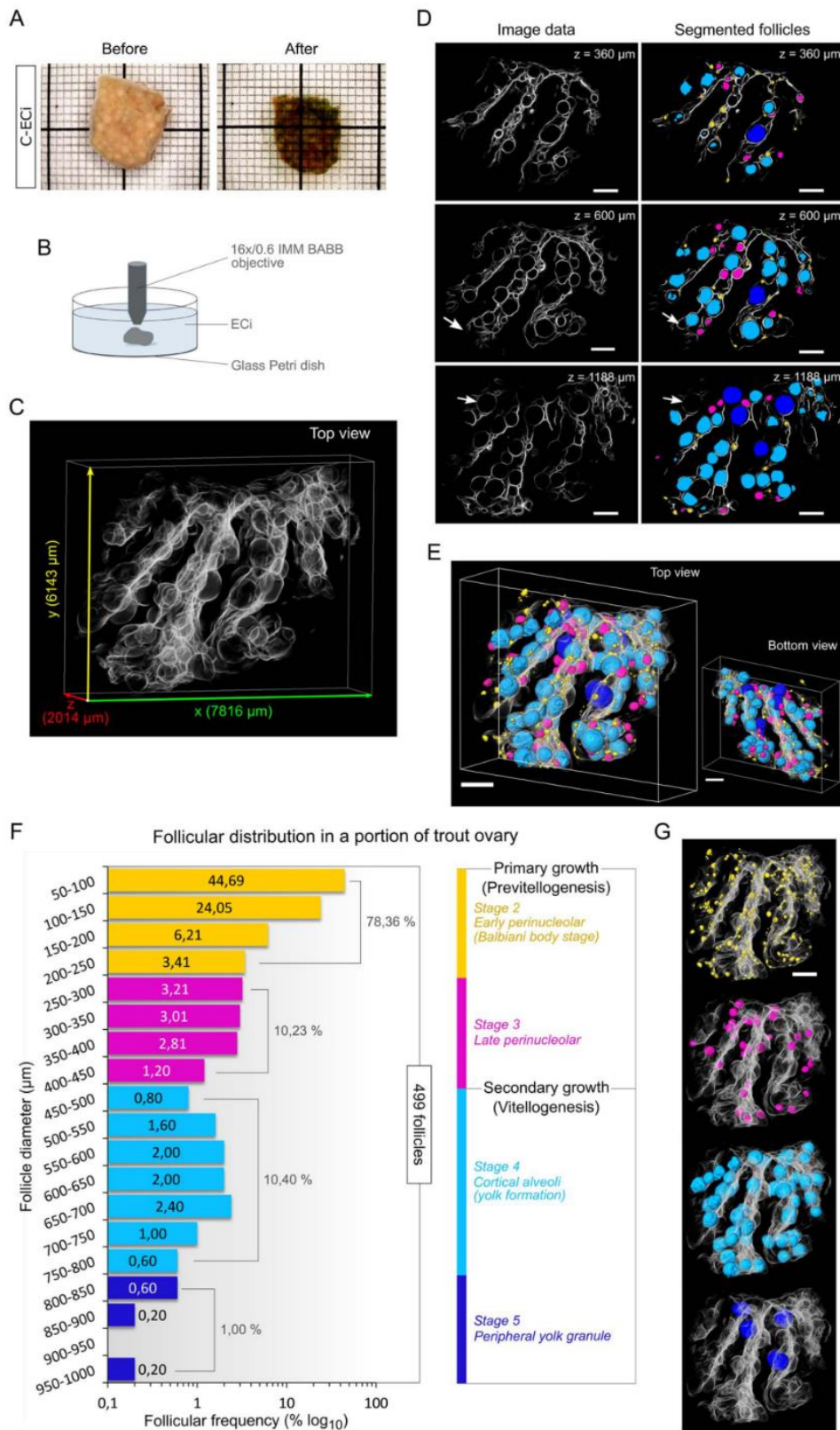


Figure 5. 3D imaging and 3D analysis of a portion of trout ovary after C-ECi clearing. (A) A portion of a trout ovary before and after clearing with C-ECi and MG staining. (B) Schematic overview of the sample mounting for confocal imaging of trout ovary portions. (C) 3D reconstruction after C-ECi clearing, MG staining, and confocal imaging. (D) XY-planes at increasing depths showing image data (left panels) and follicular 3D segmentation data (right panels). Few follicles at

displayed different populations of growing follicles of various sizes (Figure 5E). The same correction factor as for the medaka follicles was applied to estimate the real follicular diameters of a total of 499 follicles (Figure 5F). The size distribution of follicles, ranging from 50 to 993 μm diameter, was obtained. The developmental stage of follicles was determined according to their diameter and as described in previous studies [30–32]: 50–250 μm diameters (early perinucleolar stage, in yellow), 250–450 μm (late perinucleolar stage, in magenta), 450–800 μm diameters (cortical alveoli stage, in light blue), and >800 μm diameters (peripheral yolk granule stage, in dark blue). The resulting profile displayed a large predominance of small early perinucleolar follicles (78.36%, in yellow), and no evident spatial arrangement was observed in the lamella structures on 3D views of each category of follicles in this sample (Figure 5G).

To conclude, using the C-ECi protocol, we were able to analyze the follicular size distribution in the ovary of both medaka and trout, which was till now limited to late-vitellogenic and postvitellogenic follicles [33]. To our knowledge, this is the first procedure elaborated for clearing and imaging fish ovary in 3D. The main limitation of this approach is the follicular segmentation from image data, the tissue shrinkage not being considered as a major drawback as discussed previously. The 3D segmentation of image stacks indeed failed to detect a small number of follicles. The main difficulty for 3D segmentation likely comes from a somehow discontinuous staining contrast in depth. One possibility would be to refine the segmentation algorithm that should greatly benefit from recent progress in machine learning approaches. Leading edge research in machine learning recently led to accurate algorithms and software libraries dedicated to image analysis, including image segmentation, and allowed the development of deep learning approaches for the detection and counting of follicles on 2D sections of mouse ovaries [34–36]. These recent progresses are expected to contribute to the elaboration of a learning model dedicated to 3D follicular segmentation from 3D image data.

Anyhow, the C-ECi procedure is a nontoxic and efficient method for 3D follicular imaging that allows for the first time getting exhaustive and quantitative data on follicles enclosed at a given time in the fish ovary. We now expect that further kinetic analyses of the follicular content throughout the reproductive cycle of both medaka and trout will provide true quantitative data on the oogenesis dynamics in fish ovary. Beside the investigation of follicular contents, the analysis of the different cell lineages, including very early oocytes <50 μm in diameter (stage I), should bring complementary knowledge, such as the regulation of the early steps of oogenesis in the germinal cradle and the regulation of the granulosa cells differentiation. To this aim, we expect that the C-ECi clearing protocol, which combines both CUBIC and ECi methods, will be compatible with fluorescent cell markers other than MG, considering that both methods were previously individually conducted on various organs and species in combination with various fluorescent antibodies or fluorescent reporter genes [11, 13, 15, 20, 23, 37]. The next step will thus consist in combining the C-ECi protocol with fluorescent immunostainings or transgenic lines for further developmental and physiological analyses, which will open up new perspectives for a better

understanding of the biology of fish ovary. We also expect that this method could be applied to other fish species, including zebrafish.

Supplementary data

Supplementary data is available at *BIOLRE* online.

Acknowledgments

We thank the INRAE-LPGP fish facility staff and especially Cecile Duret and Guillaume Gourmelen for fish rearing and husbandry.

Conflict of interest

No competing interests declared.

Author contributions

M.L. performed image processing, data analyses and participated in the manuscript writing. M.T. performed samples clarification, samples imaging, led the setup of the C-ECi protocol, and participated in the manuscript writing. J.Bu. performed the semi-automatic 3D segmentation workflow. A.B. participated in the setup of the clearing protocol. S.G. and E.C. collected samples. M.H. and F.M. participated in data analyses. J.B. participated in the design of the study. V.T. conceived the study, and participated in data analyses, and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165:367–389.
- Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Higashijima S, Tanaka M. Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science* 2010; 328:1561–1563.
- Gay S, Bugeon J, Bouchareb A, Henry L, Delahaye C, Legeai F, Montfort J, Le Cam A, Siegel A, Bobe J, Thermes V. MiR-202 controls female fecundity by regulating medaka oogenesis. *PLoS Genet* 2018; 14:e1007593.
- McBride RS, Somarakis S, Fitzhugh GR, Albert A, Yarina NA, Wunschel MJ, Alonso-Fernández A, Basilone G. Energy acquisition and allocation to egg production in relation to fish reproductive strategies. *Fish Fish* 2015; 16:23–57.
- Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, Macewicz BJ, Lowerre-Barbieri SK. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Mar Coast Fish* 2011; 3:52–70.
- Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying tissue clearing. *Cell* 2015; 162:246–257.
- Silvestri L, Costantini I, Sacconi L, Pavone FS. Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *J Biomed Opt* 2016; 21:081205–081205.
- Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, Deverman BE, Chen C-K, Lubeck E, Shah S, Cai L, Gradinaru V. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 2014; 158:945–958.
- Ke M-T, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 2013; 16:1154–1161.

Figure 5. (continued) the border are not segmented (arrows). (E) Top and bottom views of the 3D reconstruction of the whole sample merged with the 3D segmented follicles. (F) Distribution of 3D follicular diameters. The corresponding developmental stages are indicated with different colors (from early perinucleolar stage to peripheral yolk granule stage). The follicular size distribution displays a large predominance of small early perinucleolar follicles (in yellow). (G) 3D reconstructions of follicles at the different stages. No evident spatial arrangement of the different class of follicles is observed in lamella structures. Frequencies are percentages of the total number of segmented follicles ($n = 499$). Square = 1×1 mm; Scale bars: 1 mm.

10. Affaticati P, Simion M, De Job E, Rivière L, Hermel J, Machado E, Joly J, Jenett A. zPACT: tissue clearing and immunohistochemistry on juvenile Zebrafish brain. *BIO-Protoc* 2017; 7:e2636.
11. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 2014; 157:726–739.
12. Ertürk A, Mauch CP, Hellal F, Förstner F, Keck T, Becker K, Jährling N, Steffens H, Richter M, Hübener M, Kramer E, Kirchhoff F et al. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat Med* 2011; 18:166–171.
13. Klingberg A, Hasenberger A, Ludwig-Portugall I, Medyukhina A, Männ L, Brenzel A, Engel DR, Figge MT, Kurts C, Gunzer M. Fully automated evaluation of total glomerular number and capillary tuft size in nephritic kidneys using lightsheet microscopy. *J Am Soc Nephrol JASN* 2017; 28:452–459.
14. Huang J, Brenna C, Khan A ul M, Daniele C, Rudolf R, Heuveline V, Gretz N. A cationic near infrared fluorescent agent and ethyl-cinnamate tissue clearing protocol for vascular staining and imaging. *Sci Rep* 2019; 9:521.
15. Masselink W, Reumann D, Murawala P, Pasierbek P, Taniguchi Y, Bonnay F, Meixner K, Knoblich JA, Tanaka EM. Broad applicability of a streamlined ethyl cinnamate-based clearing procedure. *Development* 2019; 146: dev 166884.
16. Wang Y, Zhang D-H, Zhang J-Y, Chen N, Zhi G-Y. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. *Food Chem* 2016; 190:629–633.
17. Feng Y, Cui P, Lu X, Hsueh B, Billig FM, Yanez LZ, Tomer R, Boerboom D, Carmeliet P, Deisseroth K, AJW H. CLARITY reveals dynamics of ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions. *Sci Rep* 2017; 7: srep44810.
18. Malki S, Tharp ME, Bortvin A. A whole-mount approach for accurate quantitative and spatial assessment of fetal oocyte dynamics in mice. *Biol Reprod* 2015; 93:113.
19. Zheng W, Zhang H, Gorre N, Risal S, Shen Y, Liu K. Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Hum Mol Genet* 2014; 23:920–928.
20. McKey J, Cameron LA, Lewis D, Batchvarov IS, Capel B. Combined iDISCO and CUBIC tissue clearing and lightsheet microscopy for in toto analysis of the adult mouse ovary†. *Biol Reprod* 2020; ioaa012.
21. Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Umadevi Venkataraju K, Zhou Y, Wang VX, Tang CY et al. Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell* 2016; 165:1789–1802.
22. Prieto D, Aparicio G, Morande PE, Zolessi FR. A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochem Cell Biol* 2014; 142:335–345.
23. Kagami K, Shinmyo Y, Ono M, Kawasaki H, Fujiwara H. Three-dimensional evaluation of murine ovarian follicles using a modified CUBIC tissue clearing method. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16:72.
24. Prieto D, Aparicio G, Machado M, Zolessi FR. Application of the DNA-specific stain methyl green in the fluorescent labeling of embryos. *J Vis Exp* 2015; 52769.
25. Mohtasham N, Mahdavi-Shahri N, Salehinejad J, Ejtehad H, Torabi-Parizi M, Ghazi N. Detection of nucleoproteins in squamous cell carcinoma, and dysplastic and normal mucosa in the oral cavity by methyl green-pyronin staining. *J Oral Sci* 2010; 52:239–243.
26. Sabatani A. Differential staining of nucleic acids. I. Methyl green-pyronin. *Cytologia (Tokyo)* 1951; 16:315–324.
27. Iwamatsu T, Ohta T, Oshima E, Sakai N. Oogenesis in the medaka *Oryzias latipes*: stages of oocyte development: developmental biology. *Zoolog Sci* 1988; 5:353–373.
28. Liebmann T, Renier N, Bettayeb K, Greengard P, Tessier-Lavigne M, Flajole M. Three-dimensional study of Alzheimer's disease hallmarks using the iDISCO clearing method. *Cell Rep* 2016; 16:1138–1152.
29. Pan C, Cai R, Quacquarelli FP, Ghasemigharagoz A, Loubopoulos A, Matryba P, Plesnila N, Dichgans M, Hellal F, Ertürk A. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods* 2016; 13:859–867.
30. Estay F, Colihueque N, Araneda C. Comparison of oogenesis and sex steroid profiles between twice and once annually spawning of rainbow trout females (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci World J* 2012; 2012: 1–7.
31. Campbell B, Dickey J, Beckman B, Young G, Pierce A, Fukada H, Swanson P. Previtellogenic oocyte growth in Salmon: relationships among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, Estradiol-17beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone, and somatolactin 1. *Biol Reprod* 2006; 75:34–44.
32. Bromage N, Cumarantunga R. Egg production in the rainbow trout. In: Muir JF, Roberts RJ (eds.), *Recent Advances in Aquaculture*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1988: 63–138.
33. Iwamatsu T. Studies on oocyte maturation of the medaka, *Oryzias latipes* VI. Relationship between the circadian cycle of oocyte maturation and activity of the pituitary gland. *J Exp Zool* 1978; 206:355–363.
34. İnik Ö, Ceyhan A, Balcıoğlu E, Ülker E. A new method for automatic counting of ovarian follicles on whole slide histological images based on convolutional neural network. *Comput Biol Med* 2019; 112: 103350.
35. Moen E, Bannon D, Kudo T, Graf W, Covert M, Van Valen D. Deep learning for cellular image analysis. *Nat Methods* 2019; 16:1233–1246.
36. Sonigo C, Jankowski S, Yoo O, Trassard O, Bousquet N, Grynberg M, Beau I, Binart N. High-throughput ovarian follicle counting by an innovative deep learning approach. *Sci Rep* 2018; 8:13499.
37. Puelles VG, Fleck D, Ortiz L, Papadouri S, Strieder T, Böhner AMC, van der Wolde JW, Vogt M, Saritas T, Kuppe C, Fuss A, Menzel S et al. Novel 3D analysis using optical tissue clearing documents the evolution of murine rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int* 2019; 96:505–516.

Article 2 : An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of Medaka ovaries

Manon Lesage^{1,#}, Jérôme Bugeon¹, Manon Thomas¹, Thierry Pécot², Violette Thermes^{1,#}

¹ INRAE, Fish Physiology and Genomics Institute, 16 Allée Henri Fabre, Rennes 35000, France.

² BIOSIT, UAR 3480 US 018, Université de Rennes 1, 2 rue Professeur Leon Bernard, Rennes 35042, France

Corresponding authors

Résumé

L'analyse d'image en microscopie consiste en des méthodes variées permettant d'extraire des informations pertinentes contenues dans des groupes de pixels. Une de ces méthodes, la segmentation, permet notamment l'identification et l'individualisation des structures d'intérêt retrouvées dans une image. Classiquement, les algorithmes se basent sur une détection des variations de texture ou de niveaux de gris, et sont ainsi particulièrement sensibles à des irrégularités de marquage fluorescents mais aussi difficiles à adapter dans le cas de cellules fortement regroupées entre elles ou de formes complexes. La segmentation d'images en 3 Dimensions s'avère d'autant plus complexe comme les irrégularités de marquages sont plus fréquentes, et la manipulation de volumes à chaque étape de l'algorithme utilisent davantage de mémoire et de temps de calcul qu'en 2D. Pourtant, avec les récentes avancées dans le domaine de la microscopie 3D et son utilisation étendue dans divers champs de la biologie, des solutions efficaces permettant l'analyse de telles images sont devenues indispensables. Pour cela, l'utilisation d'algorithmes d'intelligence artificielle a connu une exceptionnelle popularité ces dernières années grâce aux avantages qu'ils apportent pour l'analyse d'images biologiques, en particulier pour la segmentation. De nombreux algorithmes ont ainsi été développés spécifiquement pour divers jeux de données et adaptés à certains types cellulaires ou certaines modalités d'acquisition (fluorescence, microscopie électronique, colorations histologiques...). Pour augmenter l'accessibilité à de telles méthodes, certains auteurs rendent ces algorithmes disponibles en open source afin d'être réutilisés ou adaptés à d'autres jeux de données plus ou moins similaires. Pourtant, l'utilisation a encore du mal à se démocratiser chez les biologistes non spécialistes de la programmation d'algorithmes et encore relativement peu d'études rapportent l'application de ces méthodes pour des analyses fonctionnelles ou descriptives, en particulier dans les tissus ovariens.

Dans cet article, nous présentons une stratégie permettant d'utiliser des algorithmes de deep-learning préexistants, pré-entraînés ou non, afin de segmenter facilement les images d'ovaires 3D à différents stades de développement. Nous avons intégré deux outils de deep-learning open source populaires et récents, Cellpose pour la segmentation de cellules et Noise2Void pour le débruitage d'images. Par la combinaison de ces outils à des méthodes plus classiques de traitement des images et de corrections d'images segmentées, nous avons ainsi montré qu'il était possible d'adapter l'utilisation de modèles de deep-learning préexistants à deux jeux de données d'images 3D complexes différents présentant des hétérogénéités de marquage ou un marquage fluorescent à faible rapport signal sur bruit. Nos résultats ont montré une qualité de segmentation améliorée grâce au pré-traitement des images permettant l'homogénéisation des signaux fluorescents et l'amélioration des rapports signal sur bruit. De plus, une stratégie de combinaison de résultats de segmentation a été présentée pour permettre l'utilisation de Cellpose sur une même image comprenant des cellules de tailles extrêmement différentes. Ce travail constitue ainsi l'une des rares applications de modèles de deep-learning open source dans une analyse d'images 3D d'ovaires entiers. Le gain de temps et de reproductibilité apporté par la méthode par rapport à des méthodes classiques est notable et nous a permis, par la suite, d'analyser un grand nombre d'ovaires de médaka à différents stades de développement. De plus, la version révisée de ces travaux présentera une amélioration de l'automatisation des étapes de la séquence d'analyse et de traitement des images grâce à leur combinaison dans des macros utilisables sur Fiji, facilitant ainsi son utilisation et son adaptation dans d'autres études.

An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of Medaka ovaries

Manon Lesage^{1,#}, Jérôme Bugeon¹, Manon Thomas¹, Thierry Pécot², Violette Thermes^{1,#}

¹INRAE, Fish Physiology and Genomics Institute, 16 Allée Henri Fabre, Rennes 35000, France.

²BIOSIT, UAR 3480 US 018, Université de Rennes 1, 2 rue Professeur Leon Bernard, Rennes 35042, France

Corresponding authors

Keywords:

Fish, reproduction, N2V, Cellpose, confocal microscopy, 3D imaging, optical tissue clearing, Deep learning segmentation, Artificial Intelligence

Short title:

A deep-learning based workflow to assess the ovarian oocyte content in Medaka

Summary statement

An accessible image analysis method for biologists, which includes easy-to-use deep learning algorithms, designed for accurate quantitative measurement of ovarian content from complex 3D fluorescent images.

Grants support :

The DYNAMO project (Agence National de la Recherche, ANR-18-CE20-0004).

The IMMO project (grants from the INRAE Metaprogramme DIGIT-BIO).

Corresponding authors:

manon.lesage@inrae.fr

violette.thermes@inrae.fr

INRAE, Laboratoire de Physiologie et Génomique des poissons, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France

ABSTRACT

Computational analysis of bio-images by deep learning (DL) algorithms has made exceptional progress in recent years and has become much more accessible to non-specialists with the development of ready-to-use tools. The study of oogenesis mechanisms and female reproductive success in fish has also recently benefited from the development of efficient three-dimensional (3D) imaging protocols on entire ovaries. Such large datasets have a great potential for the generation of new quantitative data on oogenesis but are, however, complex to analyze due to imperfect fluorescent signals and the lack of efficient image analysis workflows. Here, we applied two open-source DL tools, Noise2Void and Cellpose, to analyze the oocyte content of medaka ovaries at larvae and adult stages. These tools were integrated into end-to-end analysis pipelines that include image pre-processing, cell segmentation, and image post-processing to filter and combine labels. Our pipelines thus provide effective solutions to accurately segment complex 3D images of entire ovaries with either irregular fluorescent staining or low autofluorescence signal. In the future, these pipelines will be applicable to extensive cellular phenotyping in fish for developmental or toxicology studies.

INTRODUCTION

As imaging methods for thick biological samples improve and become more widespread in various fields of life sciences, the volume of image data keeps growing and their analysis becomes even more complex. Biologists are therefore facing a rising need for computational tools to analyze large bio-image datasets and extract reproducible and meaningful biological information.

The fish ovary is a complex organ that shows important structural and functional changes during reproductive cycles. It contains different types of cells, including oocytes (*i.e.*, female gametes) and numerous surrounding somatic supporting cells that form, together with each oocyte, the functional units known as ovarian follicles (Lubzens et al., 2010; Nakamura et al., 2009). During oogenesis, each follicle grows and differentiates until finally giving rise to eggs that are ultimately released during spawning. One of the greatest challenges facing research on the development of ovarian dynamics and functions is the lack of an effective method to accurately count growing oocytes regardless of their stage. Studies have indeed traditionally been limited to automatic or manual oocyte counting on two-dimensional (2D) ovarian sections and extrapolation of the data to the whole organ or to manual counting of dissociated follicles (Iwamatsu, 2015a). Some studies have also focused on the development of complex stereological approaches to limit the biases induced by 2D approaches (Charleston et al., 2007). Recently, the emergence of optical tissue clearing methods and powerful microscopes have opened new perspectives with the possibility of imaging whole ovaries in three dimensions (3D), notably for mice and fishes (Fiorentino et al., 2021; Lesage et al., 2020; Soygur and Laird, 2021). It is thus now possible to generate 3D image data, generally of very large size, that ideally allows direct and comprehensive access to all structures and to achieve a precise 3D image reconstruction of the whole ovary. However, tools for 3D image analyses are still too inaccurate and tedious, especially for image segmentation, partly because of an irregular contrast signal in depth and the presence of oocytes of heterogeneous sizes, as reported previously for the adult Medaka ovary (Lesage et al., 2020). Ovarian 3D imaging therefore has a promising future, but its widespread use still relies on the availability of more efficient and easier-to-use computerized analytical tools.

In recent years, artificial intelligence (AI) has developed considerably and is proving to be highly effective for digital image analysis in biology, which has recently led to a deluge of publications in this field. Various algorithms based on deep learning (DL) have emerged and provide many applications in microscopy allowing to overcome classical limitations such as image segmentation. They allow to increase object recognition accuracy, segmentation reproducibility and enable to save a considerable amount of time for the analysis of large datasets by limiting manual interventions of users (Moen et al., 2019). Some specific methods have thus been proposed to automatically segment follicles in the mammalian ovary from histological 2D sections using a convolutional neural network (CNN) (Ínik et al., 2019; Sonigo et al., 2018). Other more generalist tools have recently emerged to democratize the use of DL technology with few prerequisites in computed coding, by providing either DL trained models accessible from public databases (<https://bioimage.io/#/>), notebooks accessible from any computer (von Chamier et al., 2021), or other open-source plugins such as CSBDeep (Weigert et al., 2018) or DeepImageJ (Gómez-de-Mariscal et al., 2021). Among the available models for cell segmentation, Cellpose is a particularly versatile one, providing a generalist pre-trained model for segmentation that can perform on various cell types in a great variety of acquisition modalities (Stringer et al., 2021). Cellpose has recently proven to be very effective in segmenting muscle fibers from 2D images

of histological sections (Waisman et al., 2021). Noise2Void (N2V) is another approach that stands out for its image denoising performance. N2V does not require noisy image pairs nor clean target images, therefore allowing training directly on the corpus of data to be denoised (Krull et al., 2019). In the era of deep learning, it thus appears that some of the routine limitations for bio-image analysis are now solved. All that remains for the biologist is the delicate task of integrating deep learning steps into the various analytical procedures for 2D and for 3D images in particular.

The aim of this study was to test the possibility of using a pre-trained open-source model to improve the critical step of segmentation of Medaka ovary 3D images without undergoing the fastidious and complex task of neural network training. We generated 3D fluorescent images of the adult ovarian follicle boundaries, by using the Methyl Green nuclear dye. We also generated 3D images of ovaries at the larvae stage, by using the autofluorescence signal in oocyte cytoplasm. For 3D segmentation of both types of images, we applied the generalist Cellpose model for oocyte 3D segmentation, which was even more efficient after image pre-processing steps and N2V denoising. A post-processing step after Cellpose was also set up to eliminate any remaining error and to combine labels when necessary. N2V and Cellpose have thus been integrated into a complete pipeline that allows an accurate estimation of the oocyte content from complex 3D images of the whole Medaka ovary.

MATERIAL AND METHODS

Ethical Statement

All fish were reared in the INRAE ISC-LPGP fish facility, which hold full approval for animal experimentation (C35-238-6). All fish were handled in strict accordance with French and European policies and guidelines of the INRAE LPGP Institutional Animal Care and Use Committee (no.M-2020-126-VT-ML, no.M-2019-48-VT-SG).

Medaka breeding and sample collection

Medaka fish (*Oryzias latipes*) from the CAB strain were raised at 26°C under artificial photoperiod dedicated to growth phase (16 h light/ 8 h dark) or reproductive cycles (14 h light/ 10 h dark). Female fish were sampled either at larvae stage (20 days post-hatch, dph) or adult stage (5 months old). Fish were euthanized by immersion in a lethal dose of MS-222 at 300mg/L supplemented with NaHCO₃ at 600mg/L and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4. Larvae were then dehydrated gradually in methanol and stored at -20°C. Adult ovaries were dissected after fixation and directly stored at 4°C in PBS + 0.5% (w/v) sodium azide (S2002, Sigma-Aldrich).

Fluorescent staining and clearing

Larvae were progressively rehydrated in PBS and ovaries were dissected. Ovaries were then permeabilized and immunostained following the iDISCO protocol with some modifications (Renier et al., 2014). Samples were successively incubated in PBS/0.2% Triton X-100 (PBSTx) for 30 min twice, PBSTx/20% DMSO for 30 min at 37°C and in PBSTx/0.1% Tween-20/20% DMSO/0.1% deoxycholate/0.1% NP40 at 37 °C for 3 h. Ovaries were washed in PBSTx

for 15 min twice, then blocked in PBS/0.1% Triton X-100/20% DMSO/6% Sheep Serum for 2H30-3H at 37°C. Samples were immunolabelled with anti-phospho-Histone H3 (Ser10) primary antibody (1:500, 06-570 Merck millipore), washed for 0.5 day in PBS/0.1% Tween-20/10µg/ml heparin (PBSTwH) under gentle agitation, and incubated with Alexa-Fluor 546 secondary antibody (1:500, A11035, ThermoFisher). Antibodies incubations were conducted for 2.5 days at 37°C in PBSTwH/5% DMSO/3% Sheep serum. Finally, stained larvae ovaries were embedded in low-melting agarose 1% before proceeding to clearing. Adult ovary samples were stained and cleared according to the C-ECi method with few modifications (Lesage et al., 2020). For staining, adult ovaries were incubated with the Methyl Green dye (MG) (40 µg/mL, 323829, Sigma-Aldrich) in PBS/0.1% Triton X-100 at 37°C for 2.5 days. After Staining, both adult ovaries and embedded larvae ovaries were dehydrated in serial methanol/H₂O dilution series supplemented with Tween-20 (2% and 0.1%, respectively), then immersed in 100% ethyl-3-phenylprop-2-enoate (ethyl cinnamate [ECi]) (W243000, Sigma-Aldrich) and finally kept at room temperature until subsequent imaging step.

Samples mounting and imaging

Image acquisitions were performed with a Leica TCS SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 16x/0.6 IMM CORR VISIR HC FLUOTAR objective (ref. 15506533, Leica, Wetzlar, Germany). For larvae ovaries, samples embedded in agarose blocks were glued on a coverslip and placed in a glass Petri dish filled with ECi. Adult ovaries were successively placed with ventral side up or down for complete imaging despite the objective working distance limitation, and mounted as described previously (Lesage et al., 2020). Mosaic z-stack tiles were stitched in Leica software using 11,72% overlap. Larvae ovaries were acquired in 1024x1024 pixels, 400Hz (unidirectional) with an optical zoom of 1.3 and a z-step of 1.63 µm (voxel size 0.52 x 0.52 x 1.6264 µm). PH3 fluorescent signal was acquired using 552 nm laser excitation slightly above optimal intensity (3-4%), and frame average was set to 2. Acquisitions took between 1.5 and 5.5 hrs according to ovary size and generated 1 to 2 GB of data. Adult ovaries were acquired in 512x512 pixels, 600Hz (bidirectional), optical zoom 0.75, z-steps 6 µm (voxel size 1.80 x 1.80 x 6.00 µm), line accumulation 2 and frame average 2. Ventral and dorsal z-stacks were acquired in about 10 hrs each and generated 8 to 10 GB of data. MG staining was detected with 638 nm laser and excitation gain compensation was used along Z axis (5 to 10% intensity).

Image processing

A schematic overview of image treatment workflows is shown on **Figure 1** ([p.89](#)). All steps were conducted on the open-source FIJI software, unless otherwise specified.

Image intensity and contrast enhancement

Before image enhancement, adult z-stacks were downsampled in order to reduce computation time. A resampling factor of 3 on X and Y axes was used, which resulted in images sizes of 1214 x 970 pixels. Progressive intensity and

gamma correction plugin was applied along the Z axis to compensate fluorescence loss in depth (Fig. 1B). For larvae, exponential or linear interpolation method were used with default parameters and intensity enhancement was set between 150 and 400% depending on samples. For adults, linear interpolation method was used, intensity set between 200 and 800% and normalization was selected (modifying range of pixel intensity values by linear scaling method). A linear gamma correction was also performed (factor 1.5) to enhance mid tones pixels on adult images. Image contrast was then enhanced by applying Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) with following parameters: block size 128, bins 256, slope 3 and fast mode, for larva; block size 512, bins 256, slope 30 and fast mode, for adult. A Fiji macro was used to apply this function on Z-stacks by batches, which is available on our GitHub page: https://github.com/INRAE-LPGP/ImageAnalysis_CombineLabels.

3D registration

Adult ventral and dorsal 3D stacks were registered, aligned and combined with the FijiYama plugin using the “two images registration mode (training)” (Fig. 1B). A manual registration was first performed to roughly superimpose the two volumes. Automatic registration was then applied for linear image transformation with block-matching alignment method. Linear transformations included rigid transformations (translation and rotation) and, if necessary, similarities transformations (rigid and isotropic homothetic factor). The two registered stacks were fused with Image calculator (Max operator), resulting in image size of 1324 x 1108 x 713 pixels.

Signal-to-noise ratios enhancement

Three-dimensional images were denoised using Noise2Void (N2V) deep-learning based tool available on Fiji, using a model trained on a few selected 3D stacks snippets. A 2D model was trained on folder containing ~15 Z-stacks snippets (512x512, from 50 to 115 z-steps) cropped from different larvae samples. Training patch shape was set at 96x96 pixels and N2V automatically used data augmentation (90, 180 and 270 rotations and flipping), thereby multiplying total patches amount by 8. The resulting pool of 2D patches were used for training (90%) and validation (10%). Training was performed with 250 epochs, 150 steps/epoch and batch size set to 128, resulting in ~13 hrs of training with our computer specifications. Denoising prediction duration was estimated to ~12 min for 1GB of data with our stated parameters (batch size 2). For adult, similar strategy was used for training, using 10 z-stack snippets (256x256, 100-200 Z-steps), patch shape 64x64 pixels. Training was performed with 300 epochs, 200 steps/epoch, batch size 128, for a total of ~9 hrs of training. Denoising prediction duration was estimated to ~8 min for 1GB of data with our hardware specifications and stated parameters (batch size 2). For image edges enhancement, stacks were subjected to a 3D median filter (x,y,z radius 1,1,1 for larvae and 2,2,2 for adult). Filtered image was then subjected to external morphological gradient computation (shape: ball; x,y,z radius 3,3,3 for larvae and 2,2,2 for adult) with Morphological filters (3D) function of MorpholibJ plugin. External gradient image was then subtracted from original pre-treated stack (without median filtering). An internal morphological gradient was also computed on larvae stacks (element shape: ball, x,y,z radius 4,4,4) and added to image data. For 3D visualization of data,

volume reconstructions were performed on the Amira software using Volren rendering (Fig 2A, E) or Volume-rendering (Fig 3A, F and 4A, F).

Deep learning 3D segmentation

Follicle segmentation was performed using Cellpose algorithm with local environment installation, launched from Anaconda command prompt (Fig. 1C). For larvae, X and Y scale were first reduced by half so that mean follicle diameter approach ~30 pixels, which is the optimum diameter for Cellpose cell segmentation (final image size 1194 x 610 pixels). Cellpose was then run in 3D with "cyto" pre-trained model, setting parameters as follows: diameter 30, cellprob threshold -2, anisotropy 1,6, min size 10. A batch size of 2 was used, depending on GPU memory allocation, resulting in ~50 min for segmentation prediction of ~250 Mb of data. Resulting masks were saved in TIFF format for subsequent data treatment. For adults, the same process was used except anisotropy was set to 1.7. 3D segmentation took ~4 hrs for ~1 Gb of data. To segment out-of-range follicles, adult stacks were downscaled once more by applying a resampling factor of 2 in X, Y and Z (no interpolation, final images size of 662 x 554 x 357 pixels). Downscaled stacks were subjected to Cellpose segmentation with diameter size set to 30 and 60 pixels. 3D segmentation took ~35 min and ~11 min for ~125 Mb of downsized data, for 30 and 60 pixel diameter respectively.

Post-processing and data extraction

For post-processing of segmented follicles, data were first slightly narrowed. For that operation, label boundaries were computed with MorpholibJ plugin and subtracted from the original Cellpose results. For larvae ovary images, labels were then post-processed on AMIRA software. Labels were subjected to an opening morphological operator (3 pixels, precise) and then filtered based on their size (Equivalent Diameter $\geq 1.5e-5m$) and shape (ShapeVAA3d ≤ 3.5). Few remaining errors were manually corrected. For adult ovary images, label shrinkage, filtration and combination were performed automatically or semi-automatically using a Fiji macro. Labels were filtered based on volume and sphericity parameters. When necessary, segmentation images were rescaled to match 3D registered image size (1324 x 1108 x 713px). The combination strategy consisted in adding largest segmented labels from downscaled images (using Cellpose diameter 30) on original scale label segmentation (Cellpose diameter 30) where largest follicles were over-segmented (**Supplemental Fig. 1**, [p.187](#)). Briefly, labels $>650\mu m$ volume-equivalent diameter (EqDiameter) were filtered from the downscaled image and added to the original scale label image after selection and deletion (using morphological reconstruction operation) of wrong labels resulting from over-segmentation. For combination of missing largest labels, a similar strategy was used with downscaled label image obtained with Cellpose diameter 60, but with semi-automatic method. Missing labels were manually selected with multi-point tool and then processed as presented before. Macro "CombineLabels" was developed in IJ1 Macro language and can be downloaded from the Github page: https://github.com/INRAE-LPGP/ImageAnalysis_CombineLabels. The volumes of all segmented follicles were exported and equivalent diameters were calculated. For adults, EqDiameter were subjected to a correction factor of 1.12 to compensate the volume shrinkage due to sample clearing, as described in Lesage *et al.* (Lesage et al., 2020). Data analysis was

performed on labels above 25 and 50 μm in diameter, for larvae and adult samples respectively. Label 3D reconstructions were generated on Amira using volume-rendering object.

Hardware and software

Data were analyzed on a 64-bit Windows 10 Pro computer equipped with a 2x Intel Xeon Silver 4110 (8 Cores, 3.0GHz) processor, a Nvidia Geforce GTX 1080 graphic card, and 384 Go of RAM. We used the Amira 2020.2 software with the XLVolume extension (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States), Anaconda3-2021.11 python distribution, Python 3.7.9, CUDA toolkit 10.0, PyTorch 1.6.0 and Cellpose v0.6.1 (Stringer et al., 2021). We also used FIJI (Schindelin et al., 2012) and the following plugins: CLAHE (Pizer et al., 1987; Zuiderveld, 1994), Progressive intensity and gamma correction (Murtin, 2016), FijiYama (fijiyama-4.0.0) (Fernandez and Moisy, 2021), CLIJ2 (clij2-2.5.3.0, Haase et al., 2020), MorpholibJ (morpholibJ-1.4.3, Legland et al., 2016), Noise2Void (n2v-0.8.6)(Krull et al., 2019) and CSBDeep (csbdeep-0.6.0)(Weigert et al., 2018).

RESULTS

3D imaging of the ovaries

To detect oocytes within the ovary at both adult and larvae stages, sample were fluorescently stained and optically cleared to allow full imaging by confocal fluorescence microscopy (**Fig. 1A**, [p.89](#)). For adult ovaries, nuclei of supporting cells surrounding the oocytes were stained with the fluorescent nuclear dye Methyl-Green (MG) identified as a convenient marker for delineating follicle boundaries (Lesage et al., 2020). For larvae ovaries (20 dph), which are composed of small early developing oocytes flanked by only a few supporting somatic cells, we took advantage of the cytoplasmic autofluorescence generated by immunostaining (here anti-phospho-histone H3 antibody, PH3). Resulting images displayed a very low signal-to-noise ratio (SNR) and a rapid loss of signal recovery in depth for larvae ovaries (**Fig. 2A-D**, [p.91](#)). Signal intensity was twice as low at 440 μm in depth compared to the top (150 μm depth, **Fig. 3B, B'**, [p.92](#)). In addition, it is noteworthy that smaller oocytes were less distinguishable than larger ones having thicker cytoplasm, especially in very compact regions (**Fig. 2D**, [p.91](#) and **3B**, [p.92](#)). Images stacks of adult ovaries displayed a higher fluorescence signal with a high SNR that was recovered up to 1152 μm in depth, although some heterogeneity in fluorescence intensity was observable (**Fig. 2F, G**, [p.91](#)). At a greater depth (2 000 μm), images display a substantial loss of signal intensity (**Fig. 4B, B'**, [p.93](#)).

Image enhancement and 3D visualization

Given the uneven signal intensity of the images, and especially the very low SNR observed with the non-specific staining of larval ovaries, we applied successive processing steps to enhance the fluorescent signal throughout Z-stacks prior segmentation. For larvae ovary, fluorescence intensity of image stacks was progressively enhanced along Z-axis to increase the signal in depth, and mean grey values were increased and homogenized to enhance contrasts (**Fig. 3B, B', C, C'**, [p.92](#)). To minimize the noise potentially introduced by intensity and contrasts adjustment and to

avoid potential aberrant enhancement of noisy structures, image stacks were denoised using the self-supervised N2V deep-learning-based algorithm (Krull et al., 2019) (**Fig. 3D, D'**, [p.92](#)). Finally, edges were refined using morphological gradients (**Fig. 3E, E'**, [p.92](#)). XY views from Z-stacks and fluorescent intensity profiles through adjacent oocytes show the progressive signal recovery over the different steps at both 150 and 440 μm in depth. It is noticeable that while normalizing grey values distribution, N2V denoising preserves oocytes edges with limited blurring effect, thus minimizing any feature loss (**Fig. 3D, D'**, [p.92](#)). In addition, it is noteworthy that overexposure was created in some cases as a side effect of edge refinement. The challenge here was therefore to find a compromise between the loss of detection of underexposed oocytes and the overexposure generated in order to achieve the greatest difference between light and dark levels. Image pre-processing steps thus enabled to increase the overall fluorescent signal intensity, to better define edges of the oocytes and to homogenize the fluorescence intensity across the Z-stack, thereby allowing a better 3D reconstruction of the larval ovary (**Fig. 3A, F**, [p.92](#)).

For 3D images of adult ovaries, a similar strategy was applied except an extra step of automatic 3D registration that was performed for the reconstruction of the whole ovary (**Fig. 4B-E and 4B'-E'**, [p.93](#)). As a result of the combination of images in the overlap region, 3D registration led to a slight increase in fluorescence intensity in this region in the final stack (**Fig. 4A, F**, [p.93](#)). XY views of Z-stacks and fluorescent intensity profiles through adjacent oocytes showed a significant increase of the SNR, especially at 2 000 μm in depth. Similar to the larvae ovary, the pre-processing allowed to improve the fluorescence signal, and especially to homogenize the fluorescence intensity through the Z-stack for a better 3D reconstruction of the adult ovary (**Fig. 4A, F**, [p.93](#)).

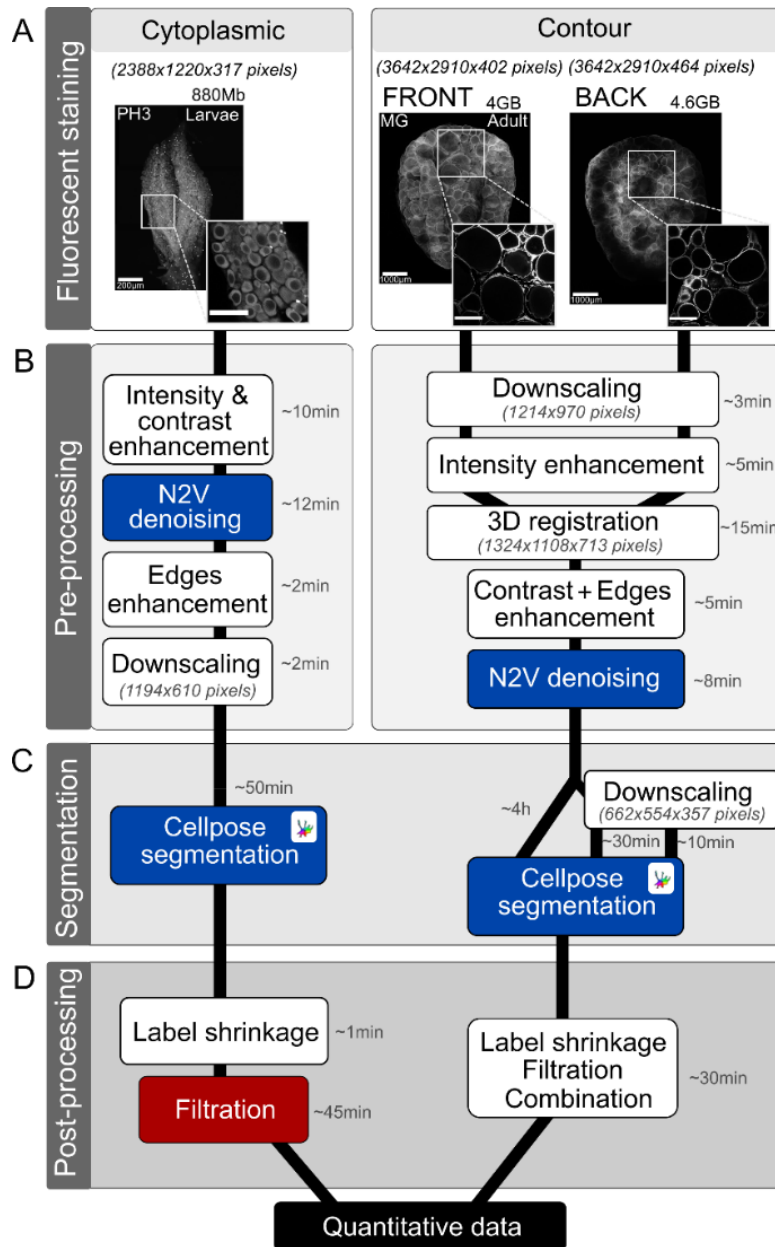


Figure 1: Pipeline overview for 3D image analysis of the whole ovary at larvae and adult stages. (A) Fluorescent staining strategies for whole ovary imaging. Cytoplasmic autofluorescence from Histone H3 phosphorylation immunofluorescence (PH3) is used for larvae (left panel). Methyl-green (MG) nuclear staining delineating follicles contour is used for adult stage (right panel). Z-projection of raw data are shown (standard deviation method). Raw stacks sizes are indicated. (B) Image pre-processing steps used for reconstruction and enhancement, listed from top to bottom. (C) 3D segmentation step is performed with Cellpose algorithm. Adult images are subjected to several segmentations runs before and after image downscaling. (D) Image post-processing is performed for segmentation correction, label filtering and final quantitative analysis. Opensource tools are indicated in white boxes, deep-learning opensource tools in blue, commercially available software in red (AMIRA). Relative computation time for one sample is indicated (B-D). Voxel size is indicated in brackets (A-C). Scale bars 200 μm (for larvae), 1000 μm (for adult), 100 μm (for larvae inset), 500 μm (for adult inset).

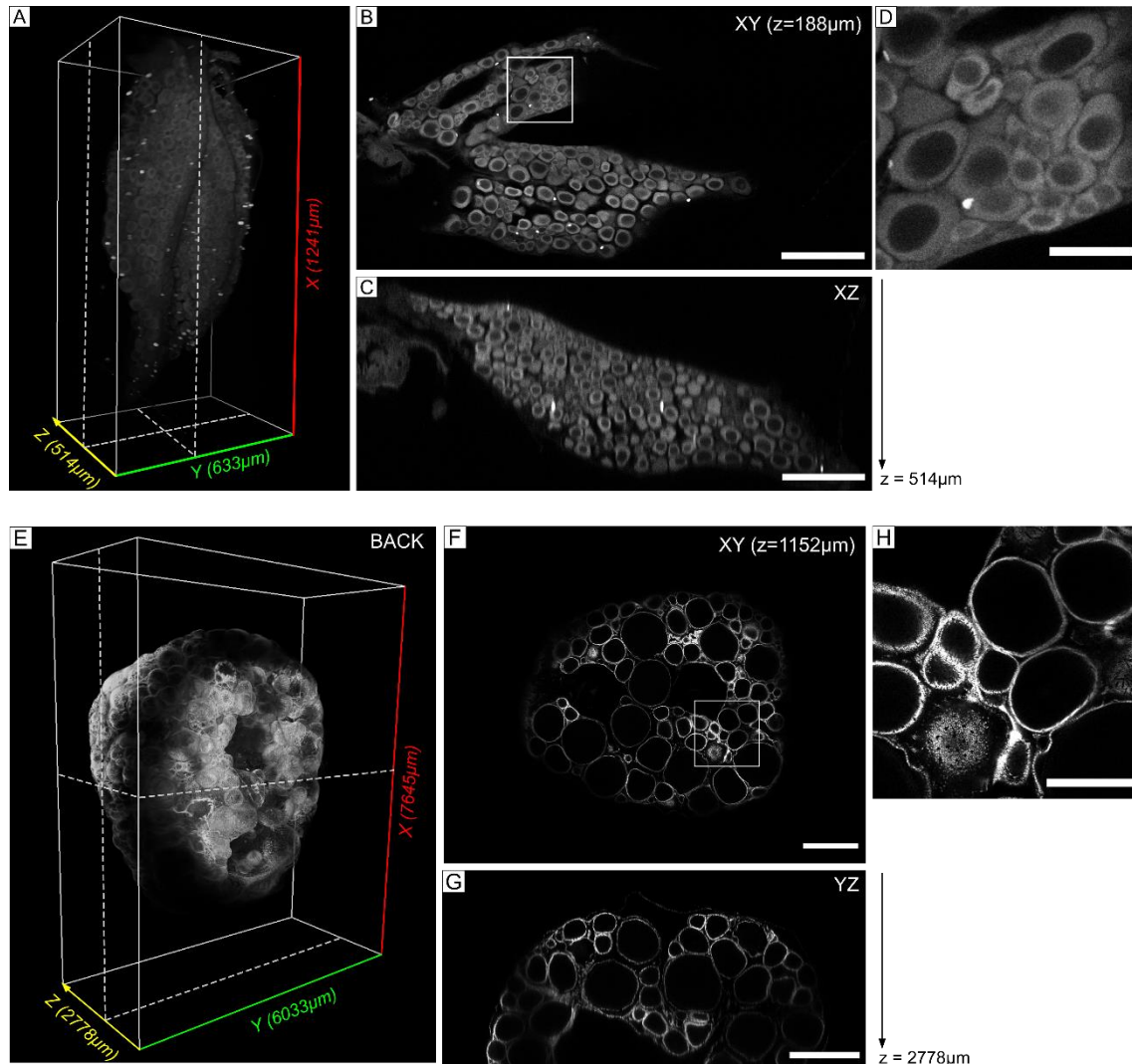


Figure 2: 3D reconstruction of whole medaka ovaries. (A) Larvae ovary reconstruction with raw data. Total ovary size approach 1240 μm in length (x), 630 μm in width (y) and 515 μm in height (z). XY plane at 188 μm and XZ plane are shown with dotted lines. (B) XY plane showing PH3 staining and cytoplasmic background in oocytes at 188 μm in depth, magnified in inset (D). (C) XZ orthoslice of larvae PH3 staining. A decrease in fluorescence intensity is observable near 400 μm in depth. (E) Adult ovary reconstruction with raw data. Only back stack (dorsal face) is shown, with a size of 7645 μm in length (x), 6033 μm in width (y) and 2778 μm in height (z). XY and YZ virtual slices are shown with dotted lines. (F) XY plane at 1152 μm depth shows MG staining resulting in delimited follicular contours, magnified in inset (H). (G) YZ orthoslice of dorsal face of adult ovary. Heterogeneity of MG staining is observable through depth. Scale bars 200 μm (B, C), 50 μm (D), 1000 μm (F, G), 40 μm (H).

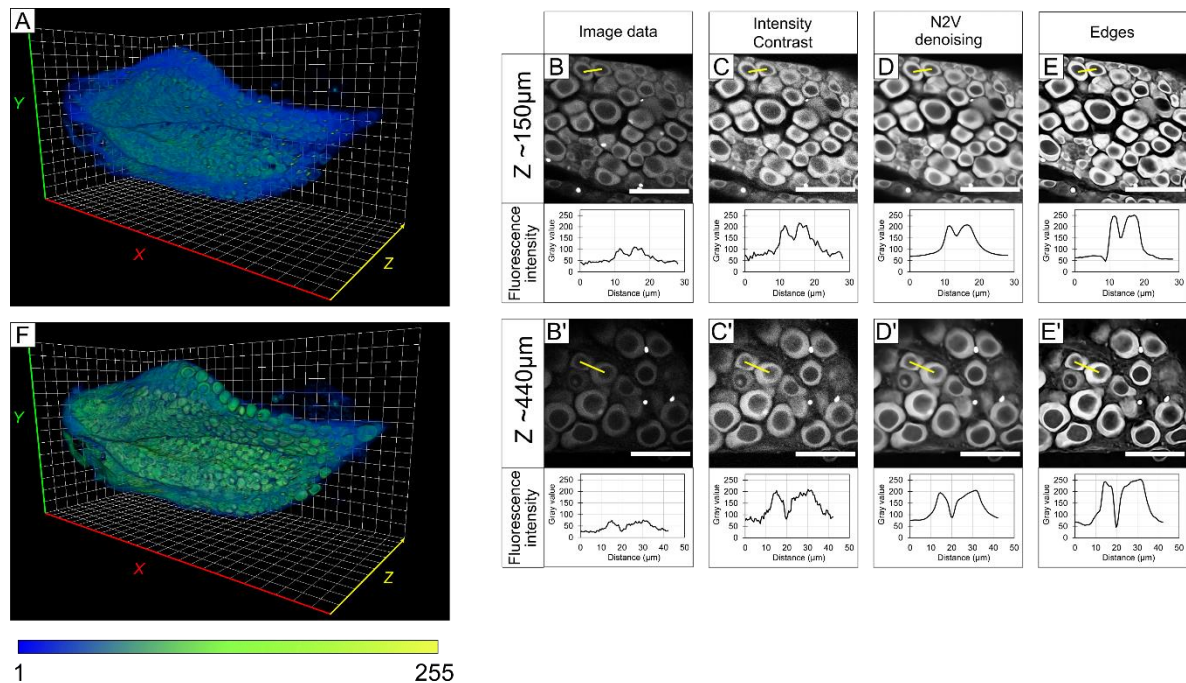


Figure 3: Image pre-processing for enhancement of features detection through larva ovary depth. (A) Representative 3D reconstruction of 20 dph (days post-hatching) larvae ovary before image processing. (B-E) Effect of successive image processing steps at 150 μm depth and (B'-E') at 400 μm depth assessed on XY cropped planes. A profile line intensity is used to assess fluorescence intensities nearby relevant objects to be segmented. Fluorescence intensity and signal to noise ratio are progressively enhanced. (F) 3D reconstruction of 20 dph larvae after image pre-processing showing signal homogenization. Color gradient is representative of grey levels (1-255). Scale bar 100 μm , Grid square size 50 μm .

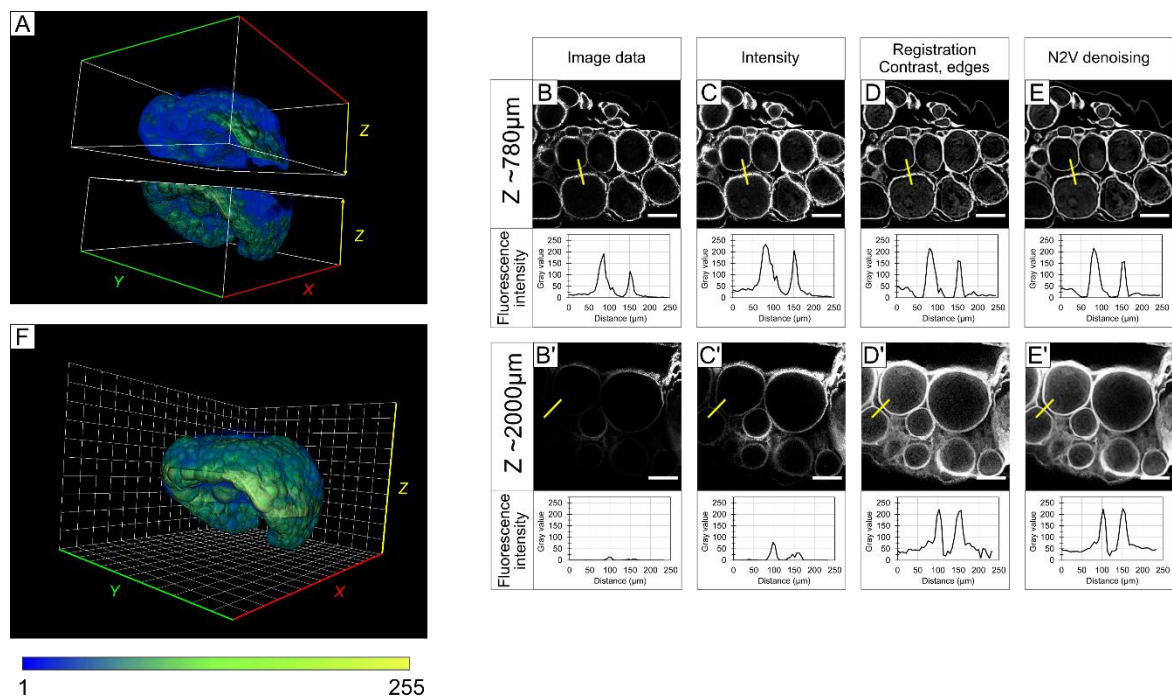


Figure 4: Image pre-processing for enhancement of features detection through adult ovary depth. (A) Volume reconstruction of front and back adult z-stacks before image processing. (B-E) Effect of successive image processing steps at 780 μm deep and (B'-E') at 2000 μm deep assessed on XY cropped planes extracted on front stack. A profile line intensity is used to assess fluorescence intensities nearby relevant objects to be segmented. Fluorescence intensity loss in depth is greatly recovered and resolution of follicles contours is improved. (L) Final adult ovary reconstruction after 3D registration and image enhancements. Color gradient representative of grey levels. Scale bar 300 μm , Grid square size 500 μm .

Cellpose efficiently identifies oocytes and follicles on 3D images

For 3D oocyte and follicle segmentation on larvae and adult images, we selected the open-source Cellpose deep-learning algorithm because of its generalist nature for cell segmentation (Stringer et al., 2021). We compared the efficiency of Cellpose for 3D segmentation before and after image pre-treatment. In both cases, Cellpose could detect either internal fluorescent staining (oocyte cytoplasm) or external fluorescent staining (somatic follicular cells), on larvae and adult ovary images respectively (**Fig. 5A-D and 5E-H, p.95**). Notably, Cellpose was much more efficient on pre-treated images than raw images. Although XZ views of larvae stacks revealed accurate segmentation along the Z axis, several undetected oocytes and some Z-label fusions were detectable in the absence of preprocessing (**Fig. 5B and 5D, insets, p.95**). For adult ovaries, segmentation of raw images leads to many cases of over-segmentation in conjunctive tissues or in large follicles, as well as fewer detected follicles, compared to segmentation of pre-processed images (**Fig. 5F and 5H, insets, p.95**).

Post-processing of label images after Cellpose 3D segmentation

Cellpose output images were post-processed to adjust the label sizes to that of the oocytes (label shrinkage) and to remove outliers (label filtration) (**Fig. 6, p.96**). Label shrinkage was performed by automatically subtracting the label boundaries to the original Cellpose labels. For adult ovaries that have the unique feature of containing heterogeneous follicle sizes (ranging from about 20 to 1 000 μm in diameter), different Cellpose label images were generated by modulating image resolution of the input image (**Fig. 6B, C, p.96**). If necessary, a 60 pixel diameter was used for Cellpose segmentation to detect largest follicles. The different resulting label images were combined in an additional post-processing step by using a Fiji Macro named "CombineLabels" (**Fig. 6D, p.96, Supp figure 1, p.187**). Images of larvae ovary labels show that, after post-processing, the majority of labels perfectly fit to the shape and size of the oocytes and that aberrant labels with elongated shapes or very small sizes were removed. In few cases, some inaccuracies still persisted, mainly under-segmentation of small oocyte clusters (**Fig. 6A, arrows, p.96**) or non-segmented oocytes (**Fig. 6A, arrowhead, p.96**). Similar to larvae ovary images, results of segmentation and post-processing of adult ovary images were highly accurate, both in terms of follicle detection, label shape and size fitting (**Fig. 6B-D, p.96**). After post-processing, remaining segmentation errors were limited to a few outlier labels located outside the relevant structures.

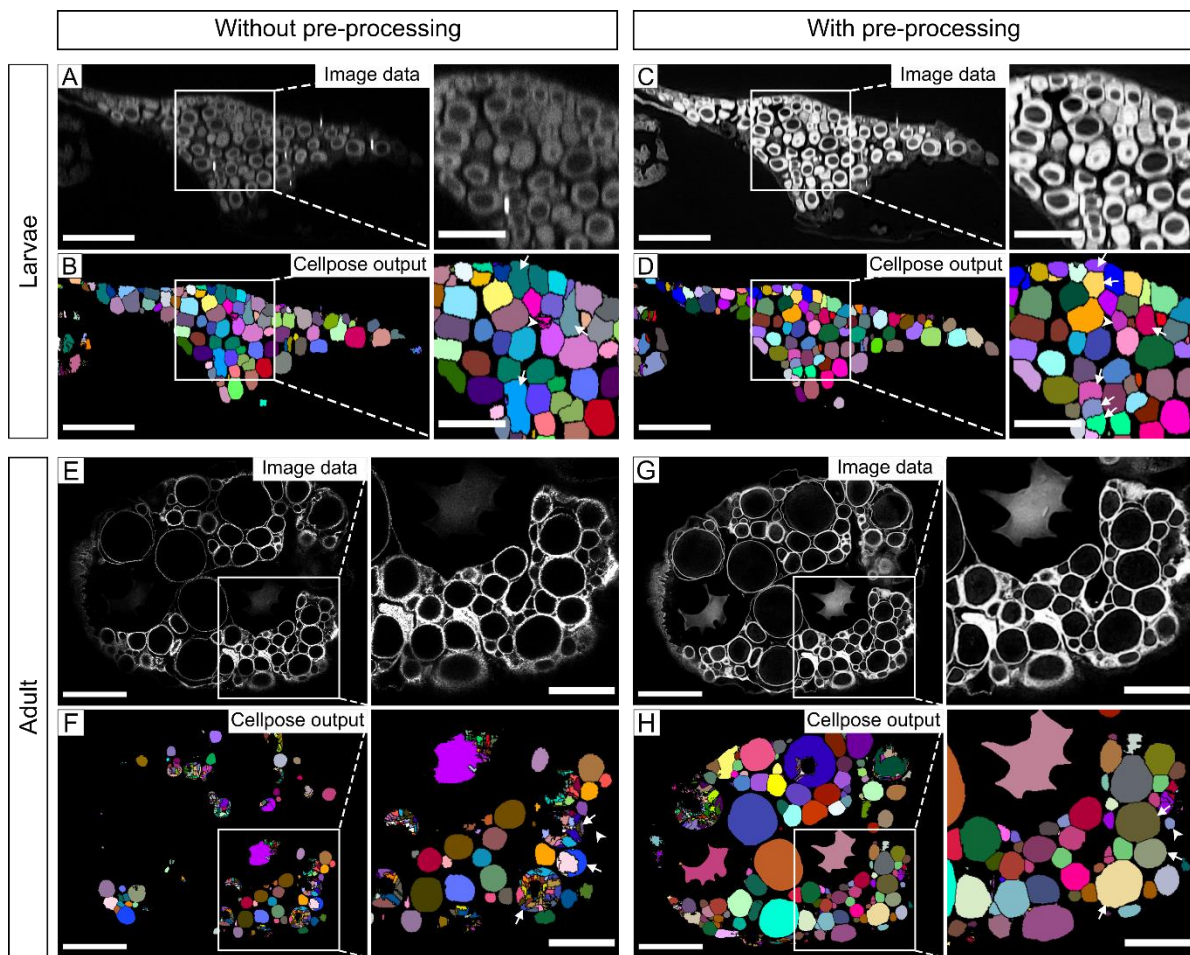


Figure 5: Effect of image pre-processing on Cellpose 3D segmentation efficiency. (A) XZ orthoslice of larvae ovary showing raw data and (C) image data after pre-processing, magnified on insets. (B) Cellpose segmentation output using raw data as input or (D) pre-processed image data. Results are shown after label erosion to correctly visualize labels individualization. Insets show more segmentation errors without image pre-processing, including unsegregated labels (arrows) or over-segmentation (arrowhead). (E) XY plane of adult ovary on raw data and (G) after image processing, magnified on insets. (F) Cellpose segmentation output for 30 pixel diameter using either raw data input or (H) pre-processed image. Segmentation results show high error number without image pre-processing, including many missing labels (arrowhead) especially in locations with heterogenous staining and high over-segmentation in medium and large size follicles. Scale bars: 200 μm (A-D), 100 μm (insets in A-D), 1000 μm (E-H), 500 μm (insets in E-H).

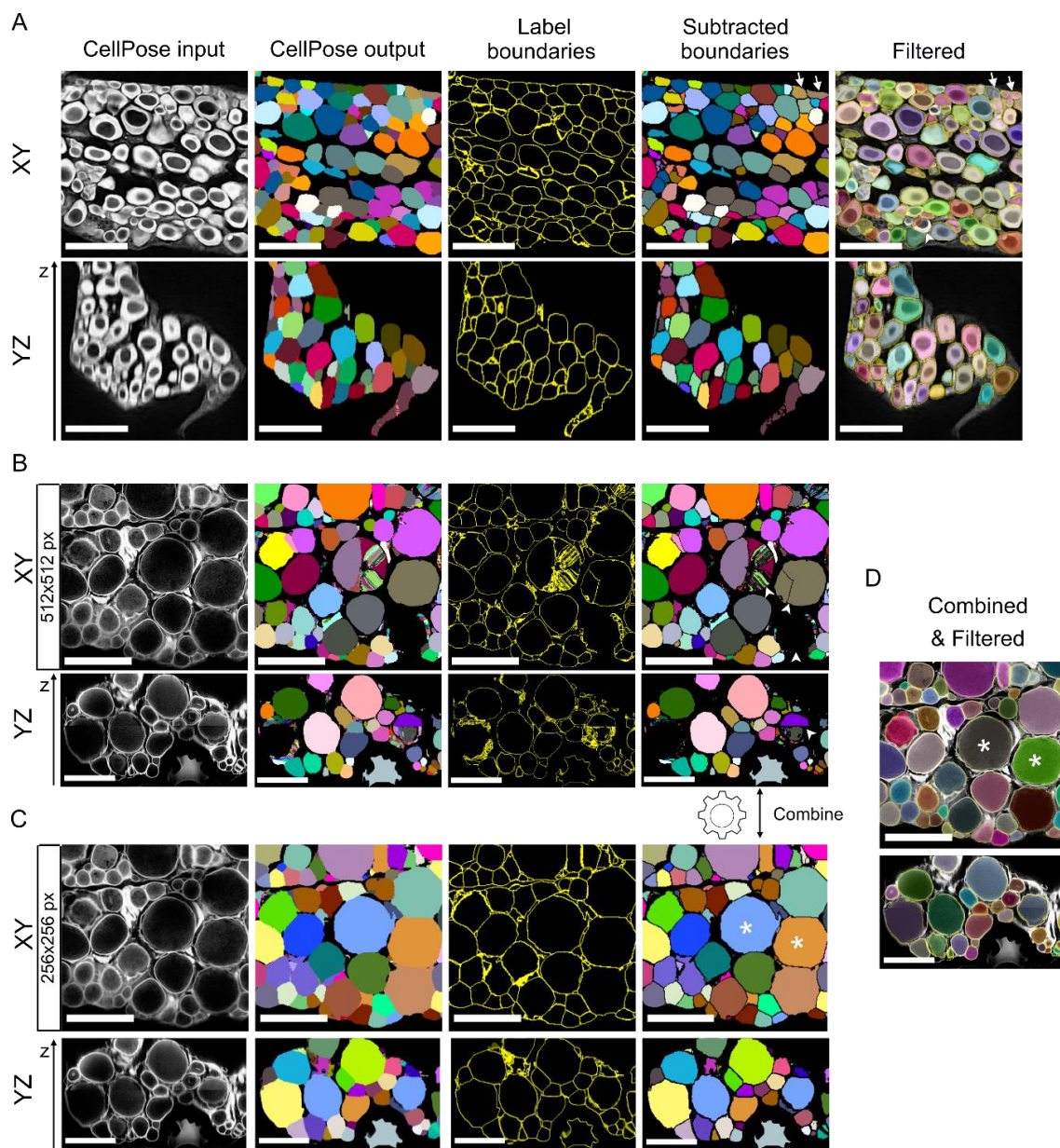


Figure 6: Post-processing corrections of segmented labels. (A, top) XY planes of 20 dph larvae ovary at ~330 μm depth showing pre-treated image data, Cellpose output, labels boundaries, eroded labels (subtracted boundaries) and final results after semi-automatic label filtration in AMIRA superimposed onto image data. (A, bottom) YZ planes for qualitative assessment of segmentation along Z-axis. Segmentation results after post-processing show good accuracy and shape fitting in XY or YZ planes with only few labels fusion for smallest oocytes (arrows) or missing label (arrowhead). (B, top) XY planes of adult ovary at ~2500 μm depth before and after Cellpose 30 segmentation. (B, bottom) YZ planes of adult ovary showing segmentation accuracy along Z axis. Largest follicles are over-segmented but other labels are correctly fitting follicles size. (C) Downscaled image data, Cellpose 30 segmentation results and post-processed images of adult data on XY plane (top) or YZ orthoslices (bottom). Large labels (stars) are combined to original scale segmentation result in (B) to replace segmentation errors of largest follicles. (D) Combined and filtered adult segmentation data superimposed onto image data. Labels show a good fit in size and shape of follicles at various sizes either on XY or YZ plane. Scale bars 100 μm (larvae panels), 1000 μm (adult panels).

Oocyte content analyses

To assess the ovarian oocyte content at both larvae and adult stages, ovaries were imaged at each of these stages and 3D computational analyses were performed following our deep learning-based pipeline. Three-dimensional reconstructions after data pre-processing revealed the thin oval-shape of larvae ovaries oriented along the anteroposterior axis, which then evolves into a thicker rounded shape at the adult stage (**Fig. 3F, 4F, 7A and 7D**, [p.92, 93, 98](#)). Ventrally, larvae ovaries exhibited lateral folds and a marked central depression, likewise adult ovaries displayed two lateral folds as well as a ventro-median bulge, giving the ovary a wheat grain appearance. Diameters of segmented oocytes or follicles were computed, classified into different size classes and merged to the 3D ovary reconstructions (**Fig. 7A', B, D', E**, [p.98](#)). The ventral and dorsal 3D views of the larvae ovary, revealed that small oocytes were preferentially visible from the ventral views, whereas larger oocytes were only observable from dorsal views, while no obvious regionalization was observable in the adult ovary (**Fig. 7B and 7E**, [p.98](#)). To analyze the relative abundance of the different size classes, the developmental stage of oocytes/follicles was determined according to their diameter and as described in the oocyte developmental table of Iwamatsu *et. al.* (Iwamatsu *et al.*, 1988). In the larvae ovary, a total of 1231 ± 182 ($n=2$) oocytes were detected. The mean size distribution showed a high predominance of small previtellogenic follicles ranging from 25 to 60 μm in diameter (chromatin-nucleolar stage, stage I), which suggests a synchronized oocyte growth during larval development (**Fig. 7C**, [p.98](#)). By contrast, all follicular developmental stages were found at the adult stage. A total of 1275 follicles were counted with a large predominance of pre-vitellogenic follicles (from stage II to IV, 50-150 μm) and of early vitellogenic follicles (stages V and VI, 150-400 μm , **Fig. 7F**, [p.98](#)). Proportion of follicles then progressively decrease as they progress through late vitellogenesis (stages VII and VIII, 400-800 μm). The pool of post-vitellogenic follicles (maturation stage IX, > 800 μm) is clearly distinguishable and reflects upcoming egg laying with a consistent number of about 23 follicles measuring more than 950 μm in diameter.

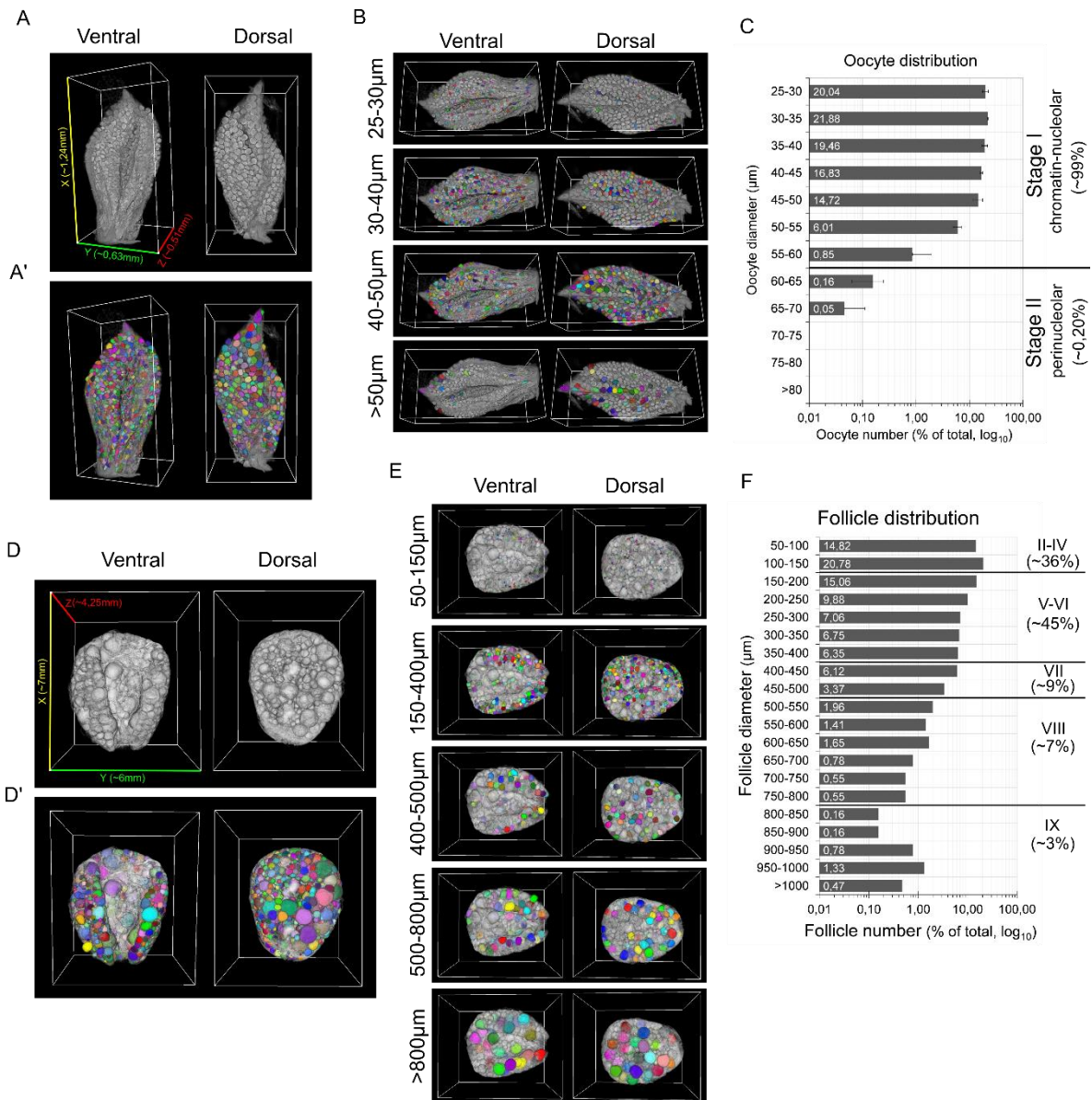


Figure 7: 3D Qualitative spatial visualization and quantitative analysis of ovarian content. (A) 3D ventral and dorsal reconstruction views of 20 dph larvae ovary, and (A') merged with segmented oocytes. Ovary size is approximately represented on bounding box measuring 1240 μm in length (x, yellow), 630 μm in width (y, green) and 515 μm in height (z, red). (B) Oocytes spatial distribution visualized by diameter range from ventral and dorsal side of larvae ovary. Oocytes tend to localize dorsally through their growth. (C) Oocyte distribution in entire larvae ovaries (mean \pm SD, n=2) depending on their equivalent diameter. Diameter measure cut-off was applied at 25 μm . Corresponding developmental stages of previtellogenesis are indicated: stage I, chromatin-nucleolar (25-60 μm) and stage II, perinucleolar (60-90 μm). (D) 3D ventral and dorsal views of entire adult ovary after registration and reconstruction, and (D') merged with 3D segmented follicles. Bounding box size approximates whole ovary size with an antero-posterior length of 7 mm (x, yellow), left to right width of 6 mm (y, green) and depth of 4,25 mm (z, red). (E) Follicles spatial distribution within ovary based on their equivalent diameter range. Follicle size classes show

respective localization of various developmental stages, namely previtellogenesis (50-150 μm), vitellogenesis (150-800 μm) and post-vitellogenesis (>800 μm). (F) Total quantification of adult ovarian content distributed by follicular diameter. Stages of development are listed, namely previtellogenesis (II-IV, 50-150 μm), early vitellogenesis (V-VI, 150-400 μm), late vitellogenesis (VII-VIII, 400-800 μm) and post-vitellogenesis (IX, 800 μm and over). Oocyte and follicular distribution are expressed as percentage of total objects counted within the ovaries.

DISCUSSION

Three-dimensional imaging of whole fish ovaries typically generates large image data sets that are particularly complex to analyze. In this study, we generated two types of 3D images. On the one hand, we generated images of adult fish ovaries with low-contrast follicle outline signal at great depths, which usually greatly impairs the final segmentation efficiency, as described previously (Lesage et al., 2020). On the other hand, we generated images of larvae ovaries with a low-contrast signal inside the oocytes throughout image stacks, which makes segmentation otherwise impossible with conventional approaches. Here, we applied the generic Cellpose pre-trained algorithm that allows cell segmentation without any manual annotation and neural network training. To optimize 3D segmentation results and maximize accuracy of oocyte/follicle content analyses, Cellpose was integrated into an end-to-end analysis pipeline.

Enhancement and homogenization of input dataset

The first part of our pipeline was dedicated to signal quality improvement in depth of raw image stacks. Such image pre-processing steps allowed improving segmentation efficiency by Cellpose. To some extent, the decrease in fluorescence level in depth on raw images should not be a major issue for predicting feature boundaries with Cellpose as it uses vector gradients representation of objects to accurately predict complex cell outlines with non-homogenous cell marker distribution (Stringer et al., 2021). However, our result indicates that the SNR is an important prerequisite for image analysis with Cellpose, in line with previous observations (Kar et al., 2021). Along with an enhanced visualization of the structures of interest across the sample, the pre-processing of 3D images therefore allows for homogenization of the data set and much more efficient 3D segmentation with Cellpose, thus increasing the reproducibility and quality of analysis.

Improvement of Cellpose output label images

Despite its high efficiency, Cellpose led to some substantial errors, including slightly oversized or aberrant labels, and it also failed to segment oocytes of highly heterogeneous sizes. To overcome these limitations and refine labels produced by Cellpose, we performed post-segmentation corrections. The size of 3D labels was adjusted following an automated boundary subtraction strategy. Our strategy differs from other methods that use the pixel-by-pixel label erosion operation, such as in LabelsToROIs Fiji plugin designed on 2D myofiber sections, and is likely to be

faster when dealing with large 3D data (Waisman et al., 2021). The combination of multiple Cellpose segmentation images, implemented with a Fiji macro "CombineLabels", also allows identification of highly heterogeneous objects sizes, that was previously not possible with Cellpose algorithm alone. It is however worth noting that there are still few inaccuracies that could not be fixed. Under-segmentations or unsegmented objects were sometimes detected mostly with larvae image datasets. Albeit minor, these errors occur in highly oocyte-dense regions or with non-optimal signal levels. Such observation is in agreement with some studies that do not recommend Cellpose for highly overlapping masks or that describe lower accuracy with over- or underexposed images (Kar et al., 2021). This could be attributed to the 2D averaging process for the 3D Cellpose extension that may have lower accuracy than a model trained with 3D data, especially for highly dense regions (Lalit et al., 2022; Stringer et al., 2021). Obviously, one can assume that better accuracy could be achieved by using a dedicated specialized DL model, and in particular with 3D trained model on our data, as shown by D.Eschweiler et al (Eschweiler et al., 2022). It would thus be interesting in the future to use our segmentation results for Cellpose algorithm fine-tuning. This could indeed limit the need for image pre-processing as well as post-processing corrections of segmentation results. But in this case, we would somewhat lose the advantage of versatile generalist models like Cellpose and different models would have to be trained for each type of data. Another solution could therefore be to improve the input images quality, by using a suitable oocyte marker to avoid sharp signal enhancement and possibly in combination with a membrane marker for better boundary discrimination. Alternatively, and in absence of such specific staining, another denoising process, either trained in three dimensions, with noisy/non-noisy paired images (CARE) or combining deconvolution process (DecoNoising), could also help objects recognition accuracy (Weigert et al., 2018; Goncharova et al., 2020).

An accurate and comprehensive content analysis of larvae and adult medaka ovaries

Implementation of Cellpose for oocytes/follicle 3D segmentation eventually enabled unbiased, reproducible and comprehensive studies for meaningful biological information, which offers great possibilities for a complete description of fish ovarian growth and development. From a morphological point of view, we could clearly distinguish the oval shape of the ovary thickening over time and shaping a bulge in the ventro-median position that connects the mesentery and attaches to the gut (Iwamatsu, 2015b; Lesage et al., 2020). *In situ* follicular size measurements by our 3D imaging and DL-based segmentation approaches allowed producing size distribution profiles for both larvae and adult ovaries. Our results are consistent with those obtained previously from dissociated follicles measured manually for the larvae ovary (Iwamatsu, 2015b) or semi-automatically from 3D images by classical watershed segmentation approaches for the adult ovary as shown in our previous study (Lesage et al., 2020). However, greater confidence can be attributed to the present study, particularly for the pre- and post-vitellogenic stages in the adult ovary for which we achieved fewer segmentation errors. In general, we also achieved a better estimation of follicle size due to the accurate shape detection enabled by the Cellpose algorithm. Interestingly, we also noticed that the spatial distribution of oocytes between 30 and 70 μm in diameter tended to be regionalized along the ventro-dorsal axis in the larvae ovary, suggesting an oriented follicular growth through this axis in consistency with observation of Nakamura *et al.* (Nakamura, 2018). In the future, the ovarian

morphogenesis and spatial organization of follicles according to their size should however be further characterized during the ovarian development by using refined 3D spatial analysis approaches.

Conclusion

Overall, the use of the generic Cellpose algorithm has been successful for 3D ovary images and has allowed ovarian segmentation of unprecedented quality. Cellpose significantly accelerated and improved the efficiency and the quality of ovarian follicles 3D segmentation in adults, leading to an accurate count and measurement of all oocyte diameters. Even more remarkably, this generalist model also allowed the successful segmentation of images of larvae ovaries with weak fluorescent signal, otherwise not exploitable with conventional methods, and quite certainly even after image pre-processing. This possibility challenges the dogma that a good raw image is necessary for an accurate object segmentation and thus significantly increases further analysis opportunities. Furthermore, thanks to its ease of use, implementation of Cellpose avoids the tedious and complex step of setting up an AI segmentation method and is therefore largely accessible to non-specialist biologists with limited coding and hardware knowledge. In the deep learning era, it is thus now clearly possible to apply such a cutting-edge technology for tissue 3D phenotyping with relative ease. To our knowledge, our pipeline is the first application using developer-to-user deep learning solutions for 3D image analysis of the ovary in vertebrates, thus opening the way for further innovative in-depth morphometric studies within the framework of developmental or toxicological studies.

Acknowledgments

We thank the INRAE ISC-LPGP fish facility staff and especially Amélie Patinote and Guillaume Gourmelen for fish rearing and husbandry.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This work was funded by The DYNAMO project (Agence Nationale de la Recherche, ANR-18-CE20-0004 to V.T.). This work has also been supported by the IMMO project (grants from the INRAE Metaprogramme DIGIT-BIO to V.T.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

Author Contributions

M.L. performed the experiments, the computational analyses and wrote the manuscript. J.B. participated to the setup of the computation bio-image analyses. M.T. participated in the setup of the clearing protocol and to the image acquisition. T.P. participated in the choice and implementation of the tool for the 3D registration of adult ovary images. V.T. conceived the study, participated in data analyses and manuscript writing. All authors reviewed drafts of the article and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Charleston, J. S., Hansen, K. R., Thyer, A. C., Charleston, L. B., Gougeon, A., Siebert, J. R., Soules, M. R. and Klein, N. A. (2007). Estimating human ovarian non-growing follicle number: the application of modern stereology techniques to an old problem†. *Human Reproduction* 22, 2103–2110.
- Eschweiler, D., Smith, R. S. and Stegmaier, J. (2022). Robust 3D Cell Segmentation: Extending the View of Cellpose.
- Fernandez, R. and Moisy, C. (2021). Fijiyama: a registration tool for 3D multimodal time-lapse imaging. *Bioinformatics* 37, 1482–1484.
- Fiorentino, G., Parrilli, A., Garagna, S. and Zuccotti, M. (2021). Three-dimensional imaging and reconstruction of the whole ovary and testis: a new frontier for the reproductive scientist. *Molecular Human Reproduction* 27, gaab007.
- Gómez-de-Mariscal, E., García-López-de-Haro, C., Ouyang, W., Donati, L., Lundberg, E., Unser, M., Muñoz-Barrutia, A. and Sage, D. (2021). DeepImageJ: A user-friendly environment to run deep learning models in ImageJ. *Nat Methods* 18, 1192–1195.
- Goncharova, A. S., Honigmann, A., Jug, F. and Krull, A. (2020). Improving Blind Spot Denoising for Microscopy.
- Haase, R., Royer, L. A., Steinbach, P., Schmidt, D., Dibrov, A., Schmidt, U., Weigert, M., Maghelli, N., Tomancak, P., Jug, F., et al. (2020). CLIJ: GPU-accelerated image processing for everyone. *Nat Methods* 17, 5–6.
- İnik, Ö., Ceyhan, A., Balcıoğlu, E. and Ülker, E. (2019). A new method for automatic counting of ovarian follicles on whole slide histological images based on convolutional neural network. *Computers in Biology and Medicine* 112, 103350.
- Iwamatsu, T. (2015). Growth of the Medaka (IV) - Dynamics of Oocytes in the Ovary During Metamorphosis. *Bulletin of Aichi Univ. of Education* 64, 37–46.
- Iwamatsu, T., Ohta, T., Oshima, E. and Sakai, N. (1988). Oogenesis in the Medaka *Oryzias latipes*: Stages of Oocyte Development: Developmental Biology. *Zoological Science* 5, 353–373.
- Kar, A., Petit, M., Refahi, Y., Cerutti, G., Godin, C. and Traas, J. (2021). Assessment of deep learning algorithms for 3D instance segmentation of confocal image datasets. *Bioinformatics*.
- Krull, A., Buchholz, T.-O. and Jug, F. (2019). Noise2Void - Learning Denoising from Single Noisy Images. *arXiv:1811.10980 [cs]*.
- Lalit, M., Tomancak, P. and Jug, F. Embedding-based instance segmentation in microscopy. *PMLR* 399–415.
- Legland, D., Arganda-Carreras, I. and Andrey, P. (2016). MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* btw413.
- Lesage, M., Thomas, M., Bugeon, J., Branthonne, A., Gay, S., Cardona, E., Bobe, J. and Thermes, V. (2020). C-Eci: A Cubic-Eci Combined Clearing Method For 3D Follicular Content Analysis In The Fish Ovary. *Developmental Biology*.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J. and Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367–389.
- Moen, E., Bannon, D., Kudo, T., Graf, W., Covert, M. and Van Valen, D. (2019). Deep learning for cellular image analysis. *Nat Methods* 16, 1233–1246.

- Murtin, C. I. (2016). Three-dimensional image analysis of high resolution confocal microscopy data of the *Drosophila melanogaster* brain. *Image Processing [eess.IV]*. Université de Lyon., 1–166.
- Nakamura, Y. T. (2018). All Oocytes Attach to the Dorsal Ovarian Epithelium in the Ovary of Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science* 35, 306–313.
- Nakamura, S., Kurokawa, H., Asakawa, S., Shimizu, N. and Tanaka, M. (2009). Two distinct types of theca cells in the medaka gonad: germ cell-dependent maintenance of cyp19a1-expressing theca cells. *Dev. Dyn.* 238, 2652–2657.
- Pizer, S. M., Amburn, E. P., Austin, J. D., Cromartie, R., Geselowitz, A., Greer, T. and Zuiderveld, K. (1987). Adaptive Histogram Equalization and Its Variations. *COMPUTER VISION, GRAPHICS, AND IMAGE PROCESSING* 355–368.
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D. J., Yang, J., Ariel, P. and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* 159, 896–910.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682.
- Sonigo, C., Jankowski, S., Yoo, O., Trassard, O., Bousquet, N., Grynberg, M., Beau, I. and Binart, N. (2018). High-throughput ovarian follicle counting by an innovative deep learning approach. *Sci Rep* 8, 13499.
- Soygur, B. and Laird, D. J. (2021). Ovary Development: Insights From a Three-Dimensional Imaging Revolution. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 698315.
- Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M. and Pachitariu, M. (2021). Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat Methods* 18, 100–106.
- von Chamier, L., Laine, R. F., Jukkala, J., Spahn, C., Krentzel, D., Nehme, E., Lerche, M., Hernández-Pérez, S., Mattila, P. K., Karinou, E., et al. (2021). Democratizing deep learning for microscopy with ZeroCostDL4Mic. *Nat Commun* 12, 2276.
- Waisman, A., Norris, A. M., Elías Costa, M. and Kopinke, D. (2021). Automatic and unbiased segmentation and quantification of myofibers in skeletal muscle. *Sci Rep* 11, 11793.
- Weigert, M., Schmidt, U., Boothe, T., Müller, A., Dibrov, A., Jain, A., Wilhelm, B., Schmidt, D., Broaddus, C., Culley, S., et al. (2018). Content-aware image restoration: pushing the limits of fluorescence microscopy. *Nature Methods* 15, 1090–1097.
- Zuiderveld, K. (1994). Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization. In *Graphics Gems*, pp. 474–485. Elsevier.

Chapitre II

Développement de l'ovaire, dynamique de l'ovogenèse et régulation par le miR-202

Résumé de chapitre

L'ovaire est un organe unique regroupant à la fois des tissus germinaux et somatiques indispensables à la fonction de reproduction. Il est aussi caractérisé par un remodelage important non seulement au cours de son développement, mais aussi tout au long du cycle de vie des femelles pour assurer la production des ovocytes, leur croissance au sein des follicules et leur ovulation de façon contrôlée dans le temps. Chez les vertébrés, les mécanismes de l'ovogenèse sont relativement bien conservés, mais les stratégies de reproduction ont pourtant évolué vers une multitude de modalités. Chez les poissons téléostéens, ces stratégies ont été le centre d'intérêt de nombreuses études cherchant à caractériser la fécondité de différentes espèces ainsi que les processus moléculaires, cellulaires ou hormonaux contrôlant l'ovogenèse. La fécondité, chez les poissons téléostéens, est directement liée au type d'organisation de l'ovaire, le type de ponte (totale ou multiple), la durée de la période de reproduction active, le taux de croissance ovocytaire mais aussi aux différents recrutements contrôlant l'entrée des follicules dans différentes phases de croissance. Diverses études se sont ainsi intéressées à la description de la dynamique de croissance des follicules et l'identification des recrutements et de leurs rythmes pour mieux comprendre et caractériser la fécondité des poissons. Chez le médaka *Oryzias latipes*, l'ovaire a été décrit largement en termes qualitatifs chez l'adulte, présentant une variété de follicules à des stades de l'ovogenèse extrêmement variés. Cependant, peu d'éléments de compréhension ont été rapportés concernant la mise en place de cette organisation particulièrement asynchrone de la croissance des follicules observée lors de la période de reproduction active. De plus, peu d'études se sont attachées à l'étude des rythmes de recrutement chez des espèces possédant une telle organisation asynchrone, notamment en raison d'une plus grande difficulté à identifier des groupes de follicules distincts. Il en résulte une certaine méconnaissance de la dynamique de l'ovogenèse, de sa régulation et leur implication dans le maintien de la fécondité chez des espèces possédant des intervalles de ponte courts et une période de reproduction prolongée comme le médaka.

Mes travaux de thèse ont ainsi consisté à étudier, grâce aux méthodes d'imagerie et d'analyse 3D mises en place, l'évolution précise de la dynamique de l'ovaire au cours du temps et d'identifier des mécanismes de régulation clés pour le contrôle de la fécondité des femelles médaka. Dans cet objectif, différentes périodes temporelles ont été étudiées, couvrant la période de croissance (période immature) des femelles jusqu'à un stade de reproduction mature, mais aussi plus particulièrement au cours d'un cycle de ponte unique durant 24 heures chez le médaka. Les

résultats ont d'abord permis d'apporter une description précise, morphologique et quantitative du développement ovarien et de la mise en place de la croissance folliculaire jusqu'à l'âge adulte. De plus, différents types de réserves folliculaires ont pu être identifiées ainsi que des étapes majeures de recrutement vers la croissance primaire ou secondaire des follicules et la formation du batch de ponte. L'importance de ces mécanismes pour le contrôle du taux de fécondité normal a été mise en évidence par l'étude d'une lignée transgénique à fécondité réduite (*miR-202-KO*), où des dérégulations des processus de recrutements ont alors été suggérés. Par ailleurs, la précision du phénotypage de cette lignée apportée par les nouvelles méthodes d'analyse utilisées dans cette étude a permis de confirmer les observations rapportées dans une étude antérieure, tout en orientant plus précisément les hypothèses de son mécanisme d'action dans l'ovaire.

Ces résultats sont présentés dans ce chapitre sous la forme de deux parties. Une première s'intéresse à l'étude du développement ovarien et de la dynamique de l'ovogenèse à différents temps du cycle de vie du médaka. La seconde partie présente les mécanismes de régulation de cette dynamique mis en évidence par l'analyse des perturbations observables chez les femelles à fécondité réduite de la lignée *miR-202-KO*.

Matériel et Méthode

Ethique, élevage des animaux et suivi de ponte

Les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les recommandations Françaises et approuvées par le comité bien-être animal. Les poissons de la lignée médaka CAB ont été élevés dans des conditions contrôlées de nourrissage (4 fois par jour), de densité dans les bacs d'élevages en fonction de leur âge, de température (26°C) et de photopériode (croissance 12h/12h ; reproduction 14h/10h (jour/nuit)). Les œufs ont été récoltés après fécondation et incubés en milieu Yamamoto à 26°C jusqu'à éclosion où les larves ont été transférées en bacs à renouvellement d'eau continu. La durée de la photopériode de croissance a été fixée à environ 3 mois post éclosion pour tous les échantillons. Les pontes des individus élevés jusqu'au passage en période de reproduction ont été suivies sur plusieurs jours ou semaines et le nombre d'œufs par ponte ainsi que la fréquence de ponte ont été évalués. Les suivis de pontes ont été réalisés, pour le phénotypage de la lignée mutante, dans des bacs isolant chaque couple constitué d'une femelle mutante et d'un mâle de la lignée sauvage. Des couples mâle/femelle sauvages ont été suivis dans les mêmes conditions.

Echantillonnage des ovaires à différents stades de développement

Des femelles médaka (lignée) ont été prélevées à différents stades de croissance (larve, juvénile, transfert, adulte) et les ovaires ont été disséqués après fixation des tissus dans la cavité abdominale. L'échantillonnage des stades larvaires a été réalisé à 30 et 40 jours post-fécondation (jpf) (équivalents à 20 – 30 jours post-éclosion (jpe), respectivement) à partir de femelles sauvages (WT, 30jpf n=10 ; 40jpf n=8) et mutantes homozygotes *miR-202* *-/-* (30jpf n=7 ; 40jpf n=8). Les stades juvéniles comprennent des femelles de 3 mois post-éclosion sauvages (n= 10) et mutantes (n=11) à 100 jours post-fécondation et des femelles sauvages à 110 jpf (n=2). Le stade transfert correspond à la période de passage à une photopériode de reproduction. Ce temps transfert a été décomposé en 2 prélèvements à partir du jour de transfert (tr), comprenant un premier prélèvement à J2 post transfert (126jpf, nommé CTJ2, n=7) puis J8 (132 jpf, nommé CTJ8, n=6) chez des individus WT.

Pour les stades adultes, les femelles WT ont été prélevées à différents temps répartis sur la durée du cycle reproducteur de 24h, à environ 2 mois post-transfert (160jpf, n=7) ou 3 mois post-transfert (190jpf, n=31). Les prélèvements ont été réalisés à des intervalles de 4h à partir du moment de la ponte (vers 9h) et sont donc définis comme suit : T0 (9h30), T1, T2, T3, T4, T5 (5h30). Le nombre d'échantillons analysés par temps sont de 10 à T0, 6 à T1, 6 à T2, 5 à T3, 7 à T4 et 5 à T5. Les stades juvéniles et transfert ont été prélevés à 17h30, heure correspondant au temps de prélèvement T4 chez adultes au cours du cycle. La chronologie des prélèvements est schématisée en figure 1A. Des femelles adultes mutantes à 2 mois post-transfert (160jpf) ont également été échantillonnées à T0 (n= 8) et T4 (n=8).

Au cours des prélèvements, la taille du corps des femelles a été mesuré selon l'axe antéro-postérieur, de la bouche à l'extrémité de la nageoire caudale. D'autres stades de développement ont été mesurés (par exemple 20, 25, 55, 65 jpf) afin d'établir une courbe de croissance (*Annexe 3, p. 182*), mais n'ont pas été utilisés à ce jour pour l'analyse

des paramètres ovariens présentés dans ces chapitres. Les femelles mutantes prélevées à différents stades de développement ont également été mesurées et comparées aux sauvages, ne révélant pas de différences significatives de croissance des poissons chez les deux lignées.

Traitement des échantillons et microscopie confocale

Les ovaires prélevés aux stades juvéniles et adultes ont été perméabilisés, marqués avec un marquage nucléaire fluorescent (Methyl-green) et transparisés, comme décrit dans l'article 1 du chapitre I. La perméabilisation aux stades larvaires ainsi que les méthodes d'immunomarquage (anti-phospho-histone 3) et transparisation sont décrites dans l'article 2 du chapitre I. L'imagerie des ovaires entiers a été réalisée par microscopie confocale telle que décrite dans les articles 1 et 2 du chapitre I. Pour les larves à éclosion, les échantillons (larves entières) ont été fixés, marqués par immunofluorescence ciblant les cellules primordiales germinales (anti-*olvas*) puis transparisés et imagés par microscopie confocale *via* l'utilisation de protocoles similaires à ceux décrits dans les articles 1 et 2 du chapitre I.

Analyse d'images

Les images de microscopie confocale ont été utilisées pour l'extraction de données quantitatives, telles que le nombre d'ovocytes, leur taille, et de mesures morphométriques telles que le volume total de l'ovaire ou le volume propre aux follicules. Le comptage des ovocytes au stade éclosion (10 jpf) a été réalisé sous Fiji, de manière manuelle. Tous les autres stades de développement ont été analysés via une segmentation automatique des ovocytes/follicules, dont la méthode est présentée dans l'article 2 du chapitre I. Brièvement, la méthode consiste à améliorer les images brutes (rapport signal sur bruit, contrastes) puis à individualiser les follicules par segmentation d'image. Le volume des follicules segmentés est ensuite mesuré ainsi que leur équivalent diamètre (diamètre d'une sphère de volume équivalent). D'autres paramètres de mesures tels que la forme ou la sphéricité sont également utilisés pour filtrer et corriger les résultats de segmentation.

Le volume ovarien a été mesuré à partir des images brutes (larves) ou segmentées (juvéniles, adultes). Pour les larves, la région correspondant au volume total de l'ovaire a été déterminée par un threshold (Top_hat) sur les images fluorescentes. Les différentes zones détectées ont ensuite été séparées (watershed/separate), et les zones ne correspondant pas à l'ovaire ont été supprimées manuellement. Le volume global a ensuite été reconstruit par des opérations morphologiques (opening, closing, fill holes) permettant d'ajuster la taille et la forme du label, de manière à correspondre à l'ovaire sur l'image fluorescente. Pour les stades juvéniles et adultes, le volume total de l'ovaire a directement été reconstruit à partir des follicules segmentés, après une opération morphologique de dilatation, de closing et enfin un opening (succession de dilatation/érosion). Les procédures ont été réalisées sous AMIRA. Les captures d'images ont été réalisées sur Fiji.

Analyse statistique

Les tests statistiques et graphiques ont été réalisés sur R. Des tests non-paramétriques ont été la plupart du temps utilisés en raison de distributions ou des résidus ne suivant pas la distribution normale. Les tests sont directement précisés dans les légendes de figures présentées dans les résultats. Les heatmaps ont été générées à partir des données de comptages normalisées par le nombre total de follicules respectivement pour chaque individu.

Partie I : Nouvelles données de compréhension de la dynamique de l'ovogenèse à différents temps chez le médaka

1. Développement de l'ovaire jusqu'à maturité des femelles

La cinétique de développement de l'ovaire a été analysée, par des critères morphométriques et quantitatifs, à partir de la phase de croissance du médaka (larve, juvénile), jusqu'à la phase de reproduction active (adultes matures). La chronologie et la nomenclature de chaque temps d'échantillonnage sont résumés dans la figure 1 (**figure 1A**, [p.112](#)). Pour cette étude descriptive, une approche par microscopie 3D sur ovaires entiers a été utilisée et a permis de générer des reconstructions 3D des ovaires à chaque stade du cycle de vie. Les images ont ensuite été segmentées afin d'en extraire des données quantitatives telles que le volume global de l'ovaire, le nombre total de follicules et la part du volume ovarien occupé par les follicules par rapport aux autres tissus (volume extra-folliculaire).

Les images représentatives des ovaires larvaire (30 jpf), juvénile (100 jpf) et adulte (160 jpf) mettent en évidence d'importantes modifications morphologiques au sein de l'ovaire entre ces stades. La forme de l'ovaire est d'abord allongée en phase de croissance, puis devient progressivement plus ovale jusqu'à l'âge adulte, alors que des follicules plus larges sont observables (**figure 1B, C, D**, [p.112](#)). Cette modification morphologique est accompagnée d'une augmentation significative du volume ovarien au cours du temps, semblant atteindre un plateau à l'âge adulte (**figure 1E**, [p.112](#)). Le volume occupé par les follicules suit une évolution similaire mais varie peu entre le stade juvénile et adulte (**figure 1E** [p.112](#)). Le nombre total de follicules croît fortement pendant la période de croissance des femelles, reste stable pendant le transfert en reproduction puis diminue progressivement avec l'âge (**figure 1G**, [p.112](#)).

Ces résultats montrent que l'augmentation du volume ovarien pendant la période de croissance semble être corrélée à une accumulation des follicules ainsi qu'à l'accroissement de leur taille. En revanche, l'élévation du volume ovarien après transfert en reproduction serait, malgré un volume folliculaire total peu différentiel, plutôt liée à l'augmentation du volume des follicules puisque leur nombre reste stable, voire diminue dans le temps.

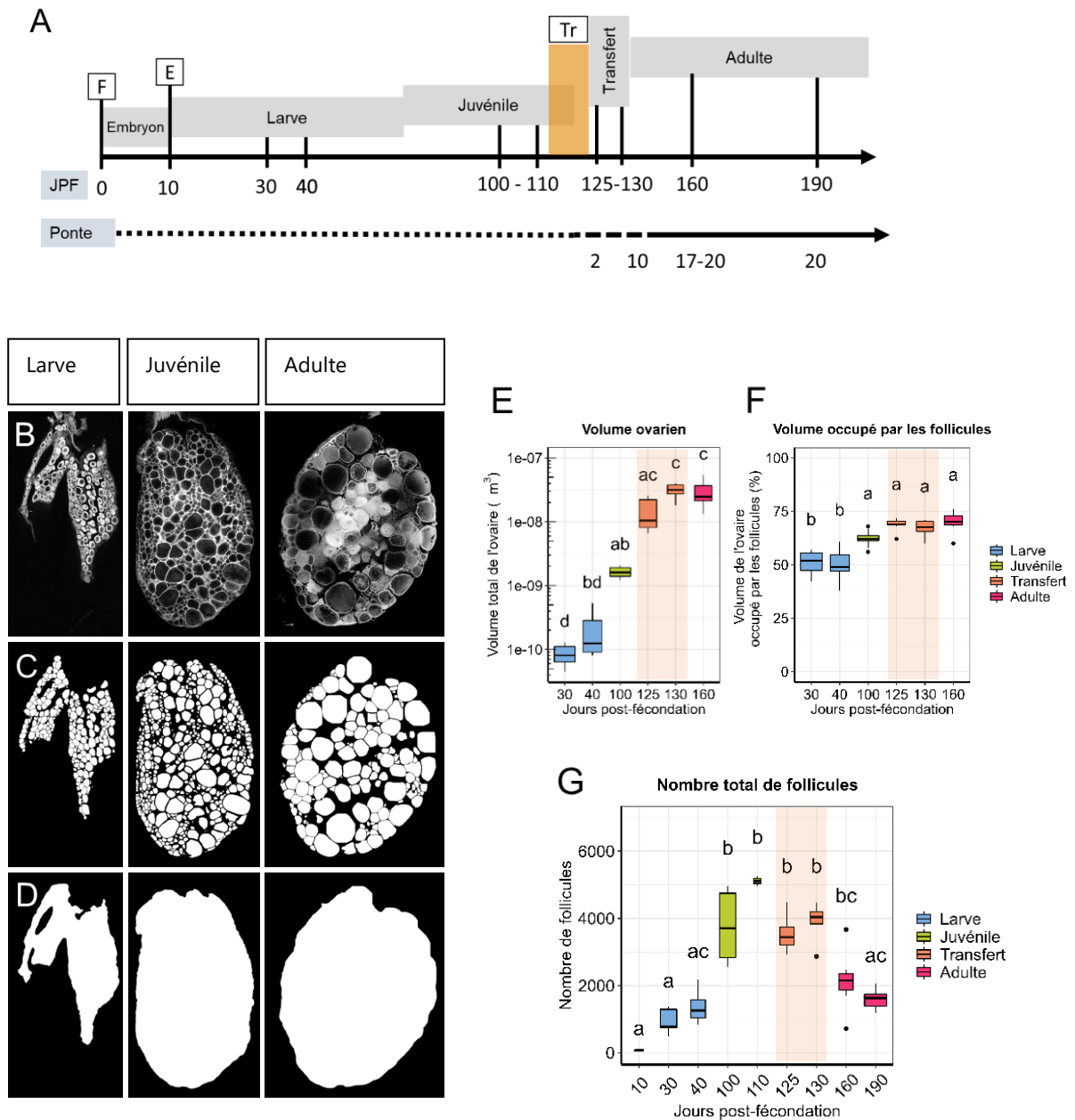


Figure 1 : Dynamique de croissance ovarienne au cours du cycle de vie du médaka. (A) Time-lapse représentatif des prélèvements effectués au cours du développement des femelles. (B) Plans virtuels XY représentatifs extraits des stacks d'images 3D prétraitées et segmentées pour détecter le volume occupé par les follicules (C) ou le volume total de l'ovaire (D) au stade larvaire (30 jpf), juvénile (100 jpf) et adulte (160 jpf). (E) Croissance du volume ovarien au cours du temps. (F) Evolution de la part du volume ovarien occupé par les follicules. (G) Evolution du nombre total de follicules au cours du temps, Test statistique : Kruskal-Wallis et post test de Dunn ($p < 0.05$).

2. Dynamique de la folliculogénèse au cours du cycle de vie

A partir de la segmentation des images 3D d'ovaires aux stades larvaires, juvéniles, transfert et adultes, le contenu folliculaire et son évolution au cours du temps ont été analysés plus précisément. Pour cela, le volume de chaque follicule a été mesuré puis exprimé en diamètre équivalent (diamètre d'une sphère de volume équivalent). Les profils de distribution du nombre moyen de follicules en fonction de leur taille ont ainsi été construits (**Figure 2, p.115**). La proportion de chaque classe de tailles de follicules dans l'ovaire a ensuite été comparée à chaque étape du cycle de vie, en utilisant les classes de tailles correspondant aux stades de l'ovogénèse décrits dans la classification d'Iwamatsu (Iwamatsu, 1988) (**Figure 3, p.116**).

Les profils de distribution des follicules par tailles montrent qu'un nombre important de follicules en pré-vitellogenèse est présent à tous les âges échantillonnés, et le nombre moyen de follicules tend à diminuer de manière inversement proportionnelle au diamètre folliculaire (**figure 2A, 2B, p.115**). Alors que les profils de distribution chez la larve (30 et 40 jpf, ou nommés aussi J20 PE et J30 PE) ne contiennent que des follicules <100 μm et varient peu entre eux, d'importantes modifications sont visibles chez la femelle juvénile (100 jpf, nommé aussi CT (J90 PE)) avec l'apparition de follicules de diamètre supérieurs, et notamment des premiers follicules en cours de vitellogenèse (**figure 2A, 2C, p.115**). Une deuxième variation majeure est observable au cours du transfert en reproduction (125 et 130 jpf, nommés aussi CTJ2 (J2 PT) et CTJ8 (J8 PT)), avec l'apparition de follicules en cours de vitellogenèse tardive (>400 μm) puis de follicules en post-vitellogenèse à mesure que les cycles de pontes s'installent. Le profil de distribution se rapproche ainsi d'une distribution observée chez l'adulte mature (160 jpf, nommé aussi ADULT), où tous les stades de développement des follicules sont présents dans l'ovaire (**figure 2B, 2C, p.115**). Les densités de follicules cumulés par période de développement illustrent nettement cette modification d'étendue vers la croissance au cours du temps, mais mettent aussi en évidence un décalage de l'enrichissement majoritaire de groupes de follicules autour de 50-60 μm chez la larve et le juvénile, vers 75 μm au cours du transfert en reproduction et autour de 125 μm chez l'adulte mature (**figure 2C, p.115**).

La répartition des follicules selon les stades de folliculogénèse d'Iwamatsu révèle de fortes variations des proportions de follicules en cours de pré-vitellogenèse (stades I à IV) en fonction de l'âge des femelles (**figure 3A, p.116**). En revanche, les proportions de follicules en cours de vitellogenèse (stades V à VIII) et de post-vitellogenèse (stades IX et X) suivent une même tendance au cours du temps, en s'accumulant de plus en plus avec la maturité des femelles (**figure 3B, 3C, p.116**). La proportion relative des follicules de stade I dans l'ovaire est majoritaire chez la larve, puis diminue au cours du temps. Chez les femelles juvéniles et en cours de transfert, une large proportion de follicules de stade I persiste (~50% et 25% des follicules, respectivement), alors que des follicules de stade II sont fortement accumulés (30%). Le nombre maximal observé de follicules de stade II est d'ailleurs atteint au stade juvénile (**figure 3A, p.116 ; Annexe 4, p.183**). De plus, une hausse de l'enrichissement en follicules de stade III marque la transition entre la période de croissance et de reproduction des femelles (**figure 3A, 3E, p.116**). Enfin, chez l'adulte, les stades I et II représentent une part des follicules 2 à 3 fois plus faible qu'en période de transfert, et le stade V (premier stade de la vitellogenèse) est le stade le plus enrichi en follicules (**figure 3A, 3B, 3G, p.116**). La formation

de deux pools de follicules est donc progressive, passant par un premier décalage en fin de croissance juvénile d'un pool plus enrichi, puis son déplacement progressif vers des stades de développement plus avancés chez l'adulte (**figure 2C**, [p.115](#)). En nombre absolu de follicules (non rapportés au contenu total), deux pools de follicules de tailles relativement synchronisés sont observables après le passage en photopériode de reproduction et correspondent aux follicules mesurant moins de 60 μm et mesurant entre 60-100 μm . Chez les adultes, les deux pools de taille plus synchronisée sont enrichis vers 60 μm et entre 100-150 μm (**figure 2C**, [p.115](#)). En revanche, l'enrichissement particulier du stade V reste peu visible sur les courbes de distributions, en raison d'un stade comportant des follicules avec des écarts de tailles plus importants (comparer **figure 2C et 3F**, [p.115](#), [p.116](#)). L'observation des tendances de modification des distributions entre les différentes périodes de croissance/reproduction mettent en évidence des points d'équilibres autour desquels l'abondance des follicules les plus petits diminuent alors que l'abondance des follicules plus larges augmentent, suggérant la présence de recrutements ayant lieu aux stades correspondants (**figure 3D, 3E, 3F**, [p.116](#)).

En conclusion, ces résultats montrent que différents stades de développements sont fortement enrichis dans l'ovaire au cours du temps, suggérant la formation de réserves de follicules. Pendant la période de croissance, les follicules aux deux premiers stades de la pré-vitellogenèse sont largement accumulés, alors que le compartiment se redistribue au profit des stades de folliculogénèse plus avancés chez l'adulte. Ceci suggère la création d'une réserve primaire de follicules pendant la phase immature de croissance, à partir de laquelle sont recrutés les follicules en cours de croissance lors du passage en photopériode de reproduction. Chez la femelle mature, cette réserve primaire persiste et semble s'équilibrer avec une réserve secondaire constituée de follicules vitellins. Cependant, deux groupes de follicules de taille relativement synchronisée sont distinguables entre le premier et le dernier stade de pré-vitellogenèse, mais les follicules de stade I semblent s'épuiser largement au cours du temps.

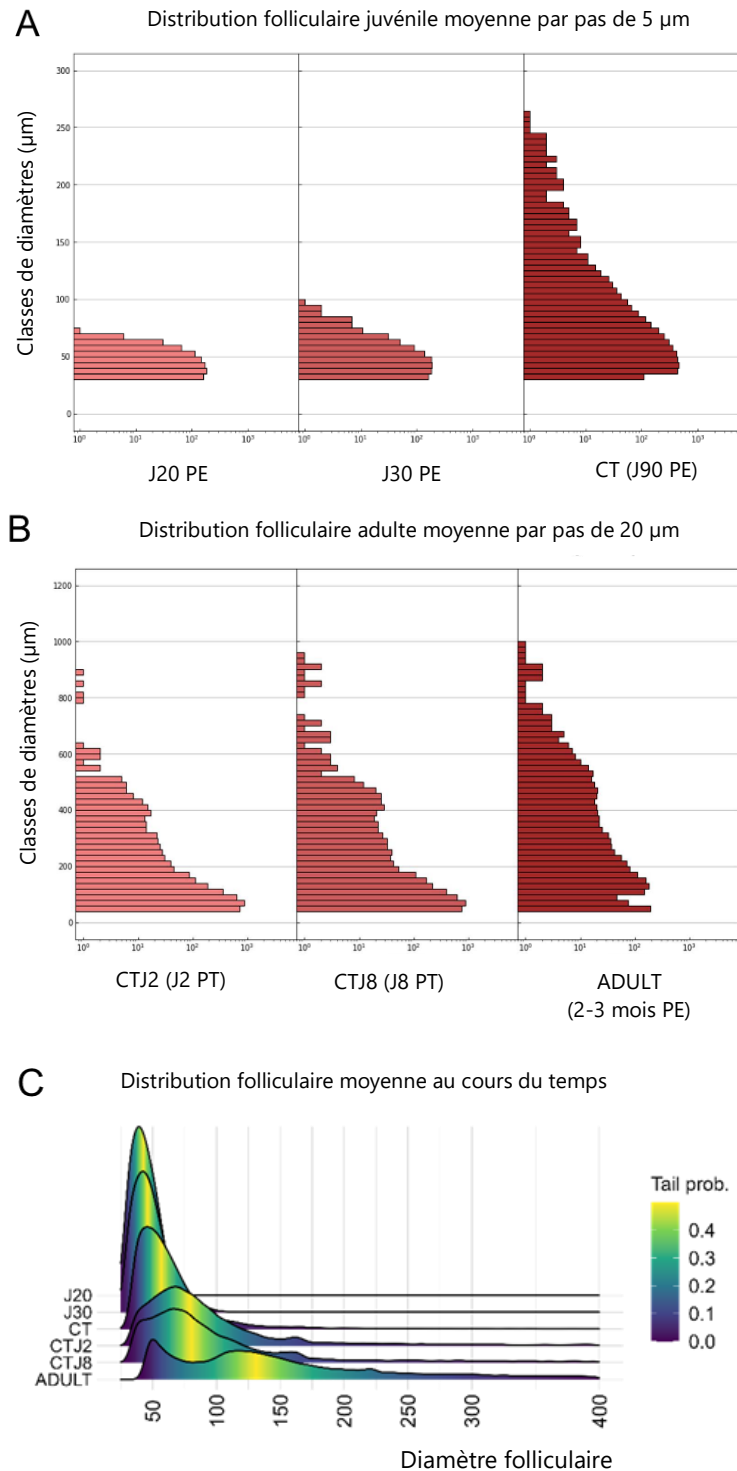
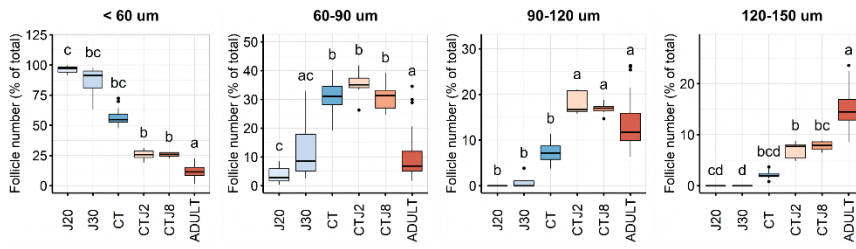
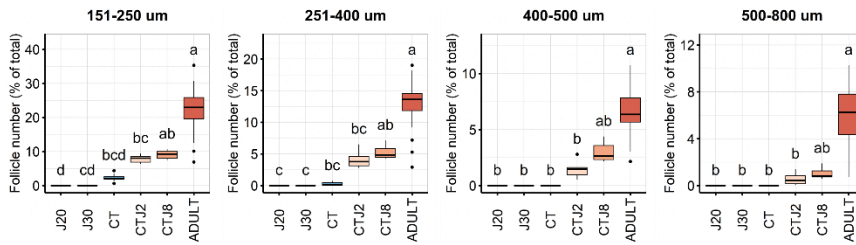


Figure 2 : Evolution de la distribution des follicules dans l’ovaire au cours du cycle de vie. (A) Nombre moyen de follicules par classes de tailles chez la larve et la femelle juvénile (classes de 5 μm de diamètre) et en cours de transfert en reproduction jusqu’à maturité (classes de 20 μm) (B). Une échelle logarithmique de base 10 est utilisée pour la visualisation de larges différences d’abondances entre les follicules selon leur taille. (C) Distribution folliculaire moyenne (cumulée) entre les stades de pré-vitellogenèse et vitellogenèse précoce à différents stades de développement ovarien. J, Jour ; PE, Post-éclosion ; PT, Post-transfert en photopériode de reproduction.

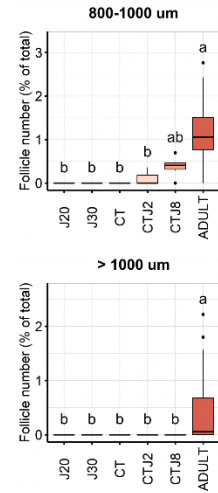
A Pré-vitellogénèse



B Vitellogénèse

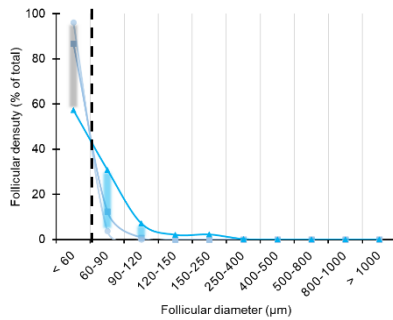


C Post-vitellogénèse



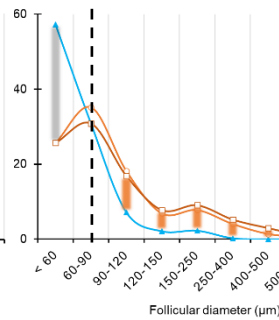
D

Croissance (Larve-Juvenile)



E

Transfert en reproduction



F

Evolution en reproduction active

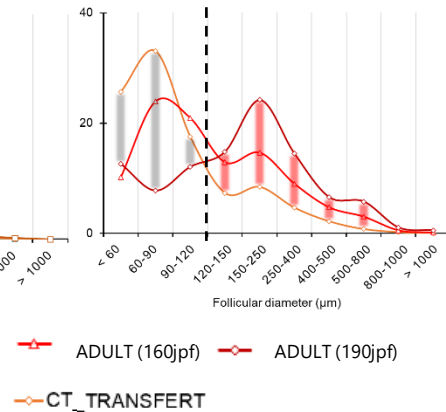


Figure 3 : Evolution des profils d'enrichissement de follicules à différents stades de l'ovogenèse au cours de la transition entre la période de croissance et de reproduction. Les densités de follicules sont exprimées en proportions du contenu folliculaire total dans l'ovaire au cours de la croissance larvaire (J20, J30), juvénile (CT), en cours de transfert en reproduction (CTJ2, CTJ8) et chez l'adulte (ADULT, moyenne des adultes à 160 jpf et 190 jpf). (A) Abondance des stades de pré-vitellogénèse, Stades I, II, III, IV. (B) Abondance de follicules en vitellogénèse, Stades V, VI, VII, VIII. (C) Abondance de follicules en post-vitellogénèse, Stades IX, X. (D) Décalage de la distribution folliculaire lors de la phase de croissance immature et apparition de follicules de stade II. (E) Croissance des follicules au-delà du stade II au cours de la transition en reproduction. (F) Evolution des pools décroissance primaire et

secondaire au cours du temps à partir du transfert jusqu'à 3mois de reproduction active. Tests statistiques : Kruskal-Wallis et post test de Dunn ($p < 0.05$).

3. Dynamique de la croissance folliculaire au cours du cycle de reproduction de 24h

Pour mieux comprendre le cycle de reproduction de 24h et les rythmes de recrutements qui l'accompagnent chez l'adulte, la dynamique de folliculogénèse au cours d'un cycle a été analysée. Pour cette étude, des femelles adultes matures ayant un rythme de ponte régulier et un nombre moyen de 20 à 30 œufs par pontes ont été prélevées (135 et 192 jpf). Les prélèvements ont été réalisés en six temps couvrant le cycle de reproduction, en commençant juste après la ponte (T0), puis à 4 heures d'intervalles (T1 à T5). Comme précédemment, les profils de distribution du nombre moyen de follicules par classe de taille de 20 μm ont été comparés entre les six temps échantillonnés (**figure 4A**, [p.119](#)). L'abondance de follicules a ensuite été analysée par classes de tailles, en définissant cette fois des intervalles de 50 μm de diamètre (**figure 4B, 4C**, [p.119](#), *Annexe 5*, [p.184](#)).

Les profils de distribution des follicules dans l'ovaire sont relativement similaires à tous les temps. Tous les stades de l'ovogénèse sont représentés, et le nombre moyen de follicules tend à diminuer de manière inversement proportionnelle au diamètre folliculaire. Cependant, un pool de follicules de large diamètre se dissocie progressivement du reste de la distribution au fil du temps, et se retrouve individualisé à T5 (**figure 4A, 4B**, [p.119](#)). Lorsque tous les échantillons sont observés en parallèle, ce décrochage est nettement visible au-delà de 800 μm de diamètre, et est confirmé par une différence significative d'abondance de follicules entre les temps à partir de 900 μm . De manière intéressante, aucun pattern particulier n'est observable au sein des classes de diamètres inférieurs correspondant à des stades de pré-vitellogenèse et vitellogenèse (**figure 4B**, [p.119](#), *Annexe 5*, [p.184](#)). La comparaison précise de l'abondance de chaque classe de follicules au cours du temps permet d'évaluer la chronologie de dissociation du pool de follicules en post-vitellogenèse (> 800 μm). Lors de la première partie du cycle (T0 à T2), les follicules sont majoritairement regroupés entre les classes de diamètres de 800 à 950 μm . En revanche, les follicules mesurant au-delà de 1050 μm de diamètre sont dénombrés quasi exclusivement en seconde partie de cycle (T3 à T5) (**figure 4C**, [p.119](#)). De manière intéressante, la classe de follicules entre 950 et 1050 μm de diamètre semble établir la transition entre ces deux parties de cycle, qui correspondent à la transition de photopériode jour/nuit.

En conclusion, au cours d'un cycle de 24h, il y a création d'un pool de follicules qui entament la dernière phase de l'ovogénèse avant ovulation. Ce pool de follicules en post-vitellogenèse se détache progressivement du reste de la réserve folliculaire qui, elle, reste stable au cours du temps. Ces résultats montrent qu'un recrutement de follicules en post-vitellogenèse se met en place juste après la ponte. De plus, ils suggèrent l'existence d'un recrutement parallèle permettant de compenser le départ du pool de follicules vers les derniers stades de l'ovogénèse.

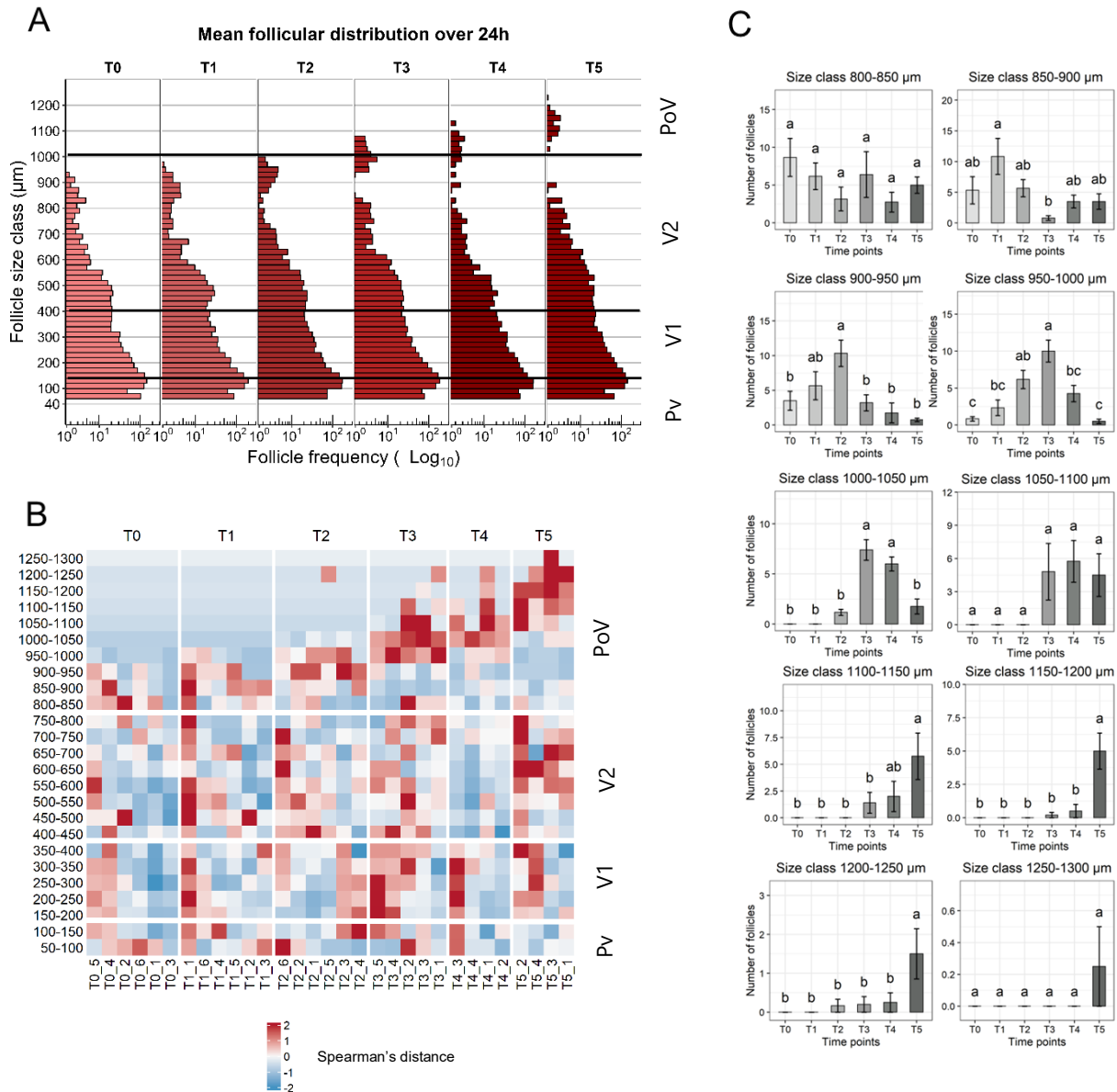


Figure 4 : Dynamique de l'ovogenèse au cours du cycle de reproduction de 24h du médaka. (A) Profils de distribution du nombre moyen de follicules par classes de tailles de 20 μm , à différents intervalles au cours du cycle de reproduction de 24h (T0, T1, T2, T3, T4, T5). Le premier temps T0 correspond à la période succédant la ponte, puis chaque temps correspond à des intervalles de 4h. (B) Heatmap représentant les variations d'abondance de follicules dans chaque classe de taille à intervalles de 50 μm en fonction du temps. (C) Abondance des follicules en fonction du temps par classe de taille de 50 μm à partir de 800 μm de diamètre. Pv, pré-vitellogénèse ; V1, vitellogénèse précoce ; V2, vitellogénèse tardive ; PoV, Post-vitellogénèse. Barres d'erreurs : sem, Stat : ANOVA et test de comparaison post-hoc de Tukey ($p < 0.05$).

4. Synthèse des résultats

L'analyse 3D de l'organisation ovarienne au cours du cycle de vie a d'abord permis d'établir une cinétique du développement ovarien incluant la mise en place de la morphologie ovarienne, de l'hétérogénéité de follicules et l'évolution du nombre total de follicules au cours du temps. L'ovaire en croissance subit d'importantes modifications morphologiques avant d'atteindre l'étape de maturité de reproduction. Une multiplication considérable et rapide du nombre de follicules a lieu entre la phase de croissance larvaire et la femelle juvénile. Cet accroissement, d'abord limité à une accumulation de petits follicules pré-vitellins chez la larve, s'étend à des stades de l'ovogenèse plus développés, jusqu'à l'apparition d'un petit pourcentage de follicules en début de vitellogenèse chez la femelle juvénile. Le volume ovarien augmente ainsi rapidement sous l'effet de l'augmentation du nombre de follicules mais aussi, vraisemblablement dans une moindre mesure, sous l'effet de leur croissance respective entre 100 et 300 μm de diamètre. En revanche, chez l'adulte reproducteur, une grande variété de larges follicules est retrouvée dans l'ovaire, alors que le volume total ovarien semble se stabiliser. Cette balance semble être acquise par une diminution progressive du nombre de follicules nettement visible après plusieurs semaines de ponte.

Par ailleurs, l'analyse de la distribution folliculaire totale et de l'enrichissement relatif de chaque stade de l'ovogenèse apporte de nouvelles données pour la compréhension de la formation de réserves/recrutements. En effet, les follicules s'accumulent à des stades de développement différents en fonction de l'âge et la croissance de la femelle. Une réserve immature est formée avant la période de reproduction active et correspond aux tous premiers stades de la pré-vitellogenèse. Chez l'adulte reproducteur, alors que cette réserve s'épuise largement par rapport aux femelles plus jeunes, les follicules s'accumulent plutôt préférentiellement à des stades plus tardifs, avec une grande proportion de follicules en vitellogenèse précoce (stades V + VI). Cependant, si le profil d'enrichissement est observé indépendamment des stades de l'ovogenèse, une forte abondance de follicules en fin de pré-vitellogenèse se distingue. Deux compartiments semblant jouer le rôle de réserves sont ainsi formés lors de la période de reproduction active. Selon la classification utilisée pour établir les profils d'enrichissement, un groupe de follicule possédant une croissance plus ou moins synchronisée peut être assimilable à une réserve secondaire.

Enfin, grâce à l'analyse de la distribution folliculaire au cours d'un cycle unique de ponte, ces travaux permettent de préciser la dynamique de recrutement associée à l'évènement de ponte chez le médaka. Un pool de follicules en post-vitellogenèse est conservé après la ponte précédente, puis s'individualise dans les 8 heures suivant la ponte, formant un hiatus caractéristique entre le batch de ponte et le reste des follicules en croissance. La transition au-delà de 1000 μm de diamètre, correspondant au dernier stade de l'ovogenèse, est particulièrement marquée lors du passage jour/nuit, et le batch de ponte est bien formé dans les 3 à 4 heures précédant la ponte (T5). L'absence de variation d'abondance significative de follicules à des stades de vitellogenèse ou de pré-vitellogenèse est en faveur d'une croissance soutenue, continue et de rythmes de recrutements entre ces compartiments équivalents au rythme de « sortie » d'ovocytes matures.

Partie II : Régulation de la dynamique ovarienne par le miR-202 au cours du temps

1. Cinétique d'expression du miR-202 dans l'ovaire en croissance

Dans cette étude, les femelles mutées pour le gène miR-202 ont été analysées à différents temps du cycle de vie du médaka. Des données d'expression ont auparavant été produites chez les femelles juvéniles et adultes, ainsi que dans l'œuf fécondé (Gay et *al*, 2018). Ces données suggèrent l'activation de l'expression du miR-202 dans les derniers stades de l'embryogenèse, mais ne permet pas d'anticiper l'évolution de cette expression jusqu'au stade juvénile. Nous avons donc, en premier lieu, analysé le pattern d'expression du miR-202 pendant la croissance larvaire des femelles médaka. L'expression du miR-202-5p a été analysé par RT-qPCR à 0, 5, 10, 15, 20 et 30 jpe (jours post-éclosion) sur des larves entières. Sa localisation dans les tissus a été analysée par Hybridation *In Situ* (HIS) à 20 et 30jpe.

Une expression significative du miR-202-5p est détectée dans la larve femelle par RT-qPCR à partir de 15 jpe, puis augmente de manière progressive jusqu'à 30 jpe (**figure 5A**, [p.122](#)). Les résultats d'Hybridation *In Situ* montrent que le miR-202-5p est faiblement marqué à 20 jpe, puis de façon plus prononcée à 30jpe. Le marquage est détectable spécifiquement dans les cellules somatiques entourant les ovocytes, dont les noyaux sont contre-marqués au Méthyl-green (**figure 5B**, [p.122](#)). Un signal non spécifique du contrôle (scramble) est détectable sur les coupes, mais est situé à l'intérieur des ovocytes, alors que le signal miR-202 est bien détecté de manière spécifique autour des follicules. La concordance de ces analyses permet de souligner la présence du miR-202-5p dans les follicules dès la période de croissance larvaire et que son expression augmente graduellement au cours du temps.

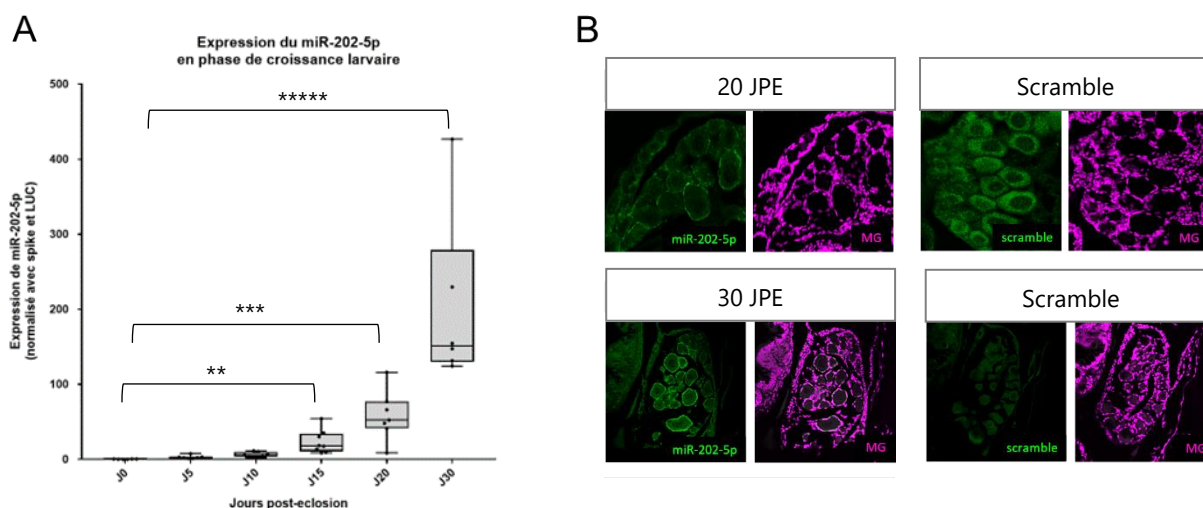


Figure 5 : Expression du miR-202 dans l’ovaire au cours du développement précoce du médaka. (A) Expression du miR202-5p dans la larve femelle à différents temps de croissance. Analyse par RT-qPCR normalisée par l’expression de cel-miR39 et LUC. (luciférase) (B) Hybridation *In Situ* à fluorescence réalisée sur coupes histologiques à 20 et 30 jours post-éclosion pour la détection de miR-202-5p (vert) et contre marquage au Méthyl-Green (MG, magenta). Statistiques : Kruskal-Wallis et Dunn’s test de multi comparaison (p-value <0.05).

2. Analyse du rôle du miR-202 dans la morphogenèse de l’ovaire

La cinétique de développement de l’ovaire chez les femelles invalidées pour le miR-202 (miR-202-KO) a été analysée et comparée aux femelles sauvages. Différents temps du cycle de vie ont été choisis et couvrent trois étapes majeures : la croissance larvaire (30 et 40jpf), la période juvénile précédant le passage en reproduction (100 jpf) et l’âge adulte avec reproduction active (160 jpf). De façon similaire à la méthode présentée en partie 1 des résultats, les données ont été extraites des images 3D d’ovaires entiers par segmentation des follicules et de l’ovaire entier.

A tous les temps du cycle de vie étudiés, l’augmentation du volume ovarien et du volume propre des follicules chez les femelles miR-202-KO suit celle des femelles contrôles sauvages sans différences significatives (**figure 6A, 6B, p.123**). Le nombre total de follicules dans l’ovaire augmente fortement en période de croissance (période larvaire et juvénile), puis tend à décroître à l’âge adulte, comme observé chez les femelles sauvages. Les comparaisons des nombres totaux moyens à chaque temps ne soulignent aucune différence significative entre les deux génotypes (**figure 6C, p.123**). Une hausse de variabilité inter-individus est toutefois observable chez les femelles mutantes, en

particulier aux temps juvénile et adulte (**figure 6A, 6B, 6C, p.123**). En conclusion, les femelles *miR-202-KO* ne présentent pas de défauts particuliers de développement à l'échelle de l'organe qui seraient susceptibles de se répercuter sur la capacité de ponte à l'âge adulte.

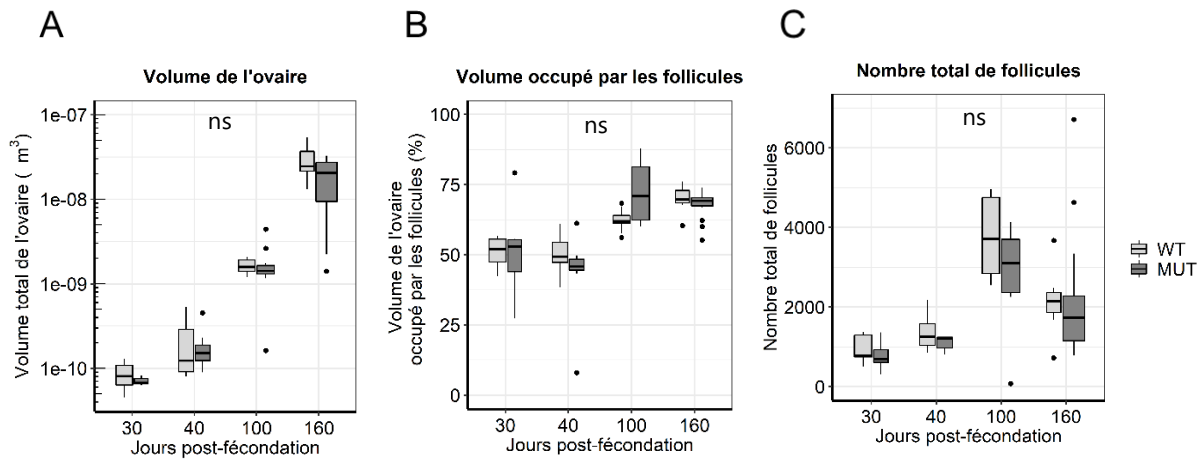


Figure 6 : Développement de l'ovaire au cours du temps chez les femelles *miR-202-KO*. (A) Volume total de l'ovaire. (B) Volume ovarien occupé par les follicules. (C) Nombre total de follicules dans l'ovaire. Aucun défaut de développement n'est observable chez les femelles mutantes en période larvaire (30, 40 jpf), juvénile (100 jpf) ou adulte (160 jpf). Statistiques : Kruskal-Wallis et Dunn's test de multicomparaison (p-value <0.05).

3. Distribution folliculaire et capacités de prolifération des cellules somatiques chez les larves mutantes *miR-202*

Pour évaluer le rôle du miR-202 dans la formation et la croissance primaire des follicules, le contenu folliculaire de l'ovaire a été analysé pendant la période larvaire, où il est majoritairement constitué de follicules aux stades I et II de la folliculogénèse. Les larves sauvages et *miR-202*-KO ont été examinées à deux stades de croissance, 30 et 40 jpf. La distribution des follicules par classes de tailles a d'abord été comparée à partir des données quantitatives extraites par segmentation des images d'ovaires 3D. Puis, le développement des cellules somatiques entourant les follicules a été examiné plus précisément par l'analyse de leur activité de prolifération dans l'ovaire. Pour cela, les cellules en cours de mitose ont été dénombrées après détection par immunofluorescence dirigée contre la phosphorylation de l'histone 3 (PH3).

La segmentation des follicules contenus dans les ovaires a permis une analyse de qualité similaire sur les deux lignées à 30 et 40 jpf. La distribution des follicules par classes de tailles est semblable chez les larves *miR-202*-KO et sauvages aux deux temps de prélèvement étudiés, avec une large majorité de follicules au stade I de l'ovogénèse (30 à 60 μm) à 30 jpf puis une distribution légèrement plus étendue au-delà de 60 μm à 40 jpf (**figure 7A, 7B**, [p.125](#)). L'immunofluorescence PH3 a pu être appliquée aux ovaires entiers et est observable dans les noyaux des cellules somatiques entourant les follicules (**figure 7C**, [p.125](#)). Le nombre de cellules en cours de mitose rapporté au nombre total de follicules (taux de prolifération) ne révèle pas de différences significatives entre les larves sauvages et KO. Cependant, une diminution du taux de prolifération est notable entre 30 et 40 jpf, vraisemblablement liée à la hausse du nombre de follicules (**figure 7D**, [p.125](#)). Pour conclure sur cette analyse, la perte de fonction du miR-202 n'engendre pas de défaut de constitution du pool primaire de follicules au stade I de l'ovogénèse, ni de défaut de formation des premiers follicules de stade II au stade larvaire. Le taux de croissance est ainsi conservé au cours de la du développement larvaire et de la différenciation ovarienne. De plus, les follicules semblent être correctement constitués avec des cellules somatiques conservant un taux de division normal. Le miR-202 ne semble donc pas avoir de rôle direct dans le développement précoce de l'ovaire et des follicules *in vivo*.

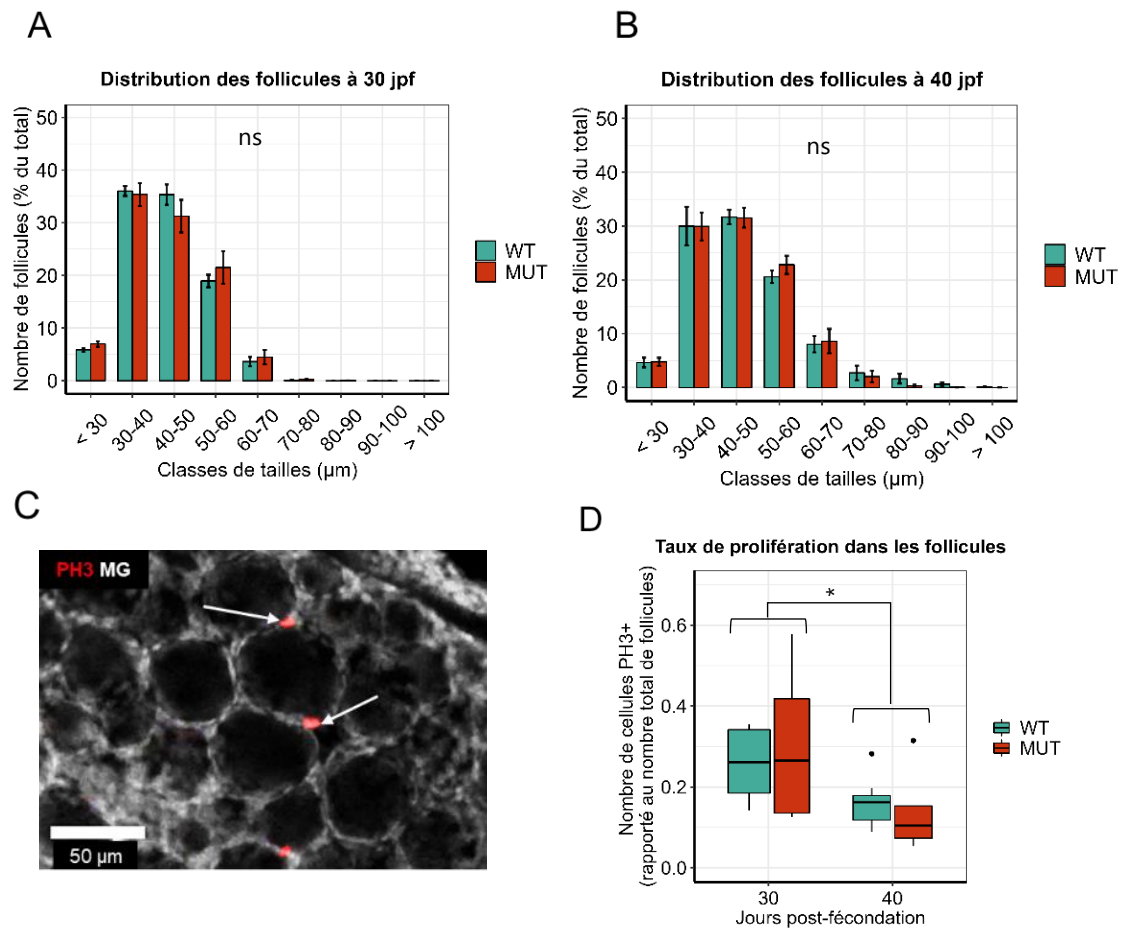


Figure 7 : Formation et croissance primaire des follicules chez la larve miR-202-KO. (A) Distribution des follicules par classes de tailles à intervalles de 10 μm dans l’ovaire larvaire à 30 jpf. (B) Distribution des follicules par classes de tailles à intervalles de 10 μm dans l’ovaire larvaire à 40 jpf. (C) Détection des cellules en mitose par immunofluorescence PH3 (rouge) et contremarquées par un marquage nucléaire au Méthyl-Green. Les flèches pointent des cellules de la granulosa *ph3+* entourant un ovocyte. (D) Taux de prolifération des cellules somatiques dans l’ovaire à 30 et 40 jpf.. Test Wilcoxon ($p < 0.05$).

4. Analyse de la fréquence de distribution des follicules en fin de période de croissance

Des défauts de croissance des follicules ont été auparavant suggérés (Gay et al, 2018) chez les femelles *miR-202-KO* au stade juvénile. La méthode alors utilisée ne permettant pas une exploration complète du contenu ovarien, une analyse complémentaire a été réalisée à 90 jpf par une approche sur ovaire entier. Comme précédemment, les ovaires de femelles juvéniles ont été imagés et reconstruits en 3D, puis segmentés afin d'extraire le nombre de follicules et leur taille respective. Un profil de distribution par classes de tailles a été généré pour chaque individu sauvage ou *miR-202-KO*, avec des classes définies par un pas de 50µm, et les proportions moyennes de chaque classe ont été comparées entre les deux groupes. Le contenu folliculaire a également été examiné par classes de tailles définies selon les stades de l'ovogenèse d'Iwamatsu (Iwamatsu 1988).

Les distributions moyennes montrent un déplacement global des profils chez les femelles *miR-202-KO* vers des classes tailles de follicules plus larges (**figure 8A, p.127**). Alors que la classe de follicules de diamètre inférieur à 50 µm occupe une part des follicules totaux moins abondante chez les femelles mutantes, il y a une augmentation significative de la proportion de follicules appartenant aux classes de diamètre de 50-100 µm et 300-350 µm (**figure 8A, p.127**). L'exploration des distributions individuelles, classifiées selon les stades de l'ovogenèse, révèle une plus grande variabilité des profils entre les individus *miR-202-KO* que chez les individus sauvages, même si ces derniers présentent tout de même une variabilité notable suggérant des taux de croissance variables. De manière cohérente avec les observations des proportions moyennes observées en figure 8A, un enrichissement des follicules de stade II ainsi qu'une diminution de l'abondance relative des follicules de stade I sont notables chez la majorité des femelles mutantes (**figure 8B, 8C, p.127**). Parmi ces individus, trois possèdent également une proportion nettement plus importante de follicules se trouvant au-delà du stade V (**figure 8B, 8D, p.127**). Les quatre derniers individus possèdent une distribution de follicules se rapprochant des individus contrôles (**figure 8B, 8C, 8D, p.127**). Différents types de profils de distribution peuvent ainsi être considérés chez les femelles juvéniles *miR-202-KO* selon le type de dérégulation observable : déplacement du pic d'abondance vers le stade II (« *Shifted* »), apparition précoce de follicules en vitellogenèse (« *Flattened* ») ou similaires aux sauvages (« *Wild-type like* »). De plus, ces perturbations peuvent se combiner, suggérant un effet délétère plus sévère sur la fécondité ultérieurement (**figure 8B, p.127**). Ces résultats mettent en évidence un rôle du *miR-202* dès le stade de croissance juvénile, et suggère en particulier son implication dans la régulation de différentes étapes de la croissance folliculaire. Ces analyses illustrent également une variabilité de pénétrance du phénotype lié à la perte de fonction du gène *mir-202*. Dans l'ensemble, deux effets majeurs sont relevés, et peuvent parfois être couplés : un dérèglement de la formation de la réserve primaire juvénile et une croissance prématurée des follicules.

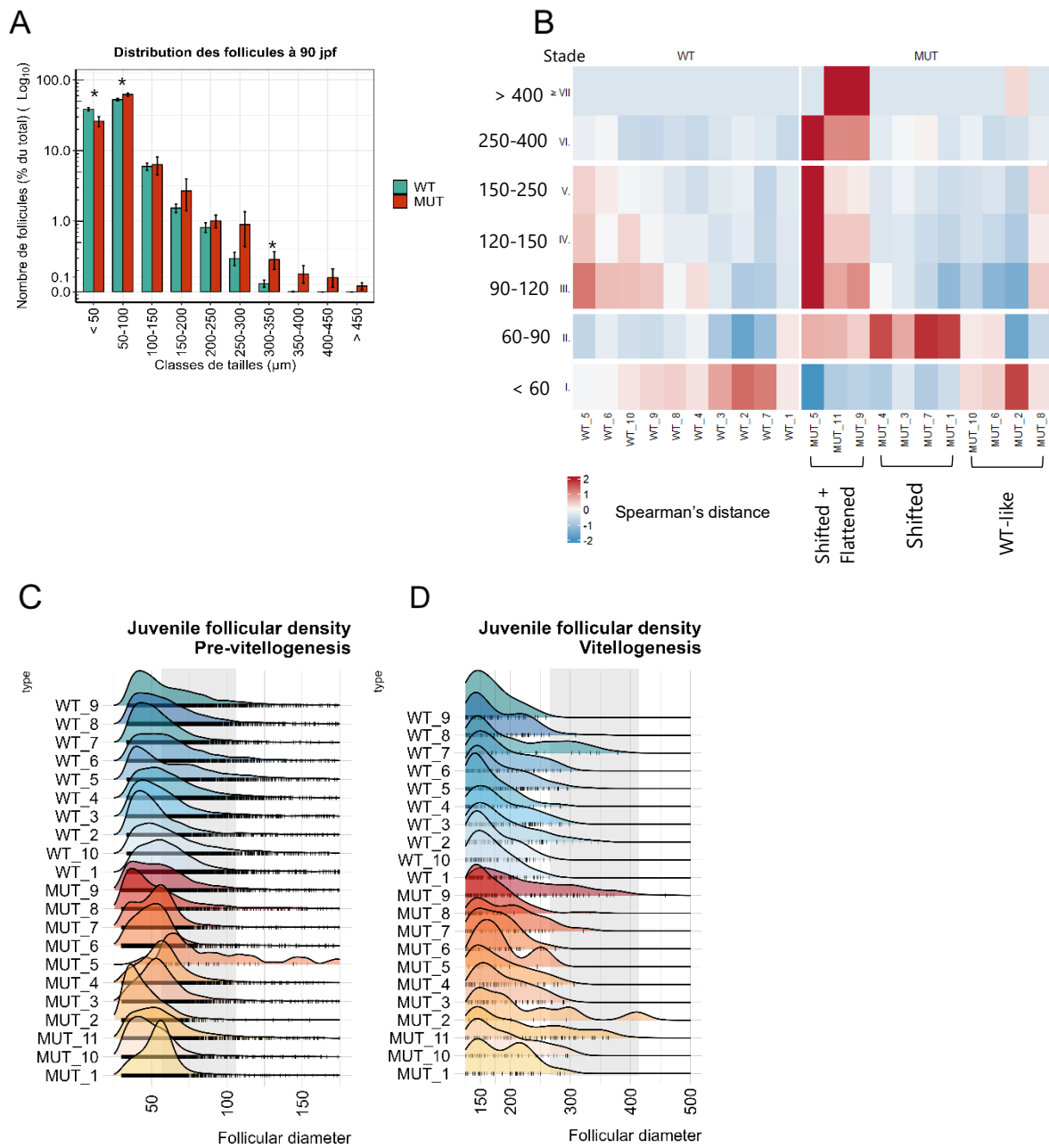


Figure 8 : Dynamique de la croissance folliculaire chez les femelles juvéniles *miR-202-KO*. (A) Distributions moyennes des follicules à 90jpf par classes de tailles de 50 µm. (B) Heatmap représentant les variations d'enrichissement des stades de l'ovogenèse entre individus sauvages et mutants. (C) Profils de densités de follicules en cours de pré-vitellogenèse (D) Profils de densités de follicules en cours de vitellogenèse. WT, individus sauvages ; MUT, individus *miR-202-KO*. Barres d'erreurs : sem. Test : Wilcoxon ($p < 0.05$)

5. Régulation de la folliculogenèse et la fécondité par le miR-202 à l'âge adulte

Le rôle du miR-202 dans la régulation des cycles de ponte a été analysé chez l'adulte par l'identification des défauts de folliculogenèse et l'étude de leurs conséquences sur la fécondité des femelles *miR-202-KO*. La fécondité de chaque femelle a été suivie pendant plusieurs jours (fréquence de ponte et nombre d'œufs pondus), puis les ovaires ont été prélevés à deux temps correspondant à la période après ponte ou à la deuxième partie de cycle de reproduction (T0 et T4, respectivement). Le contenu ovarien a été analysé par microscopie et analyse d'image 3D, et les proportions moyennes des follicules par classes de tailles (intervalles de 50 μm) ont été comparées entre les groupes sauvages et *miR-202-KO*. Le contenu folliculaire a également été examiné par classes de tailles définies selon les stades de l'ovogenèse d'Iwamatsu (Iwamatsu 1988). Enfin, la corrélation entre le profil de distribution des follicules dans l'ovaire et le phénotype de fécondité a été examinée via la comparaison des types de dérégulations observées

Les distributions moyennes des follicules par classes de 50 μm à T0 montrent des profils de forme globalement similaires entre les deux génotypes, mais avec d'importantes différences de proportions. Une accumulation significative des follicules mesurant entre 50 et 100 μm est observée chez les femelles *miR-202-KO*, alors que de nombreuses autres classes sont significativement moins abondantes, notamment entre 150 et 300 μm et de 400 à 800 μm de diamètre (**figure 9A**, [p.130](#)). Ces différences ne se retrouvent pas de manière prononcée au temps T4, bien qu'une tendance similaire soit observable. Une baisse du nombre de follicules mesurant plus de 1050 μm est toutefois notable (**figure 10A**, [p.131](#)).

Les profils de distributions individuels des femelles mutantes ont été examinés afin d'estimer la variabilité inter-individuelle et d'évaluer par quelles perturbations il est possible de les regrouper (**figure 9B**, [p.130](#), **figure 10B**, [p.131](#)). Les profils individuels des femelles sauvages ont aussi été explorés et possèdent une certaine variabilité restant toutefois moins fréquente et ayant à priori moins d'ampleur que chez les mutantes (*Annexe 6*, [p.185](#); *Annexe 7*, [p.185](#)). Les individus mutants ont ensuite été comparés, pour chaque temps, à la moyenne des individus sauvages correspondants afin d'établir une classification en fonction du profil de distribution observé (**figure 9B**, [p.130](#), **figure 10B**, [p.131](#)). De la même manière que chez les femelles juvéniles, trois catégories peuvent être décrites. Des individus possédant une accumulation de follicules aux stades II et III de l'ovogenèse et une proportion fortement réduite de follicules plus larges ont été associés à une classe « Strong », comprenant 2 individus à T0 et 3 à T4. Un second groupe d'individus, défini comme « Mild », possède une distribution relativement similaire au profil sauvage moyen mais présente une faible proportion de follicules les plus larges. Il comprend 3 individus à T0 et 3 à T4. Enfin, un groupe « WT-like » est associé aux mutants présentant une distribution comparable à la distribution moyenne des femelles contrôles.

Les profils de densité de follicules mettent en évidence une discrimination plus complexe des mutantes que dans le cas des femelles au stade juvénile. Toutefois, il est possible de distinguer, aux deux temps étudiés, des perturbations au sein des différents compartiment folliculaires en cours de croissance primaire (pré-vitellogenèse), secondaire (vitellogenèse) ou de maturation finale (post-vitellogenèse). En pré-vitellogenèse, certains mutants présentent une distribution enrichie dans les stades de croissance précoces, et un nombre réduit de follicules dans les derniers stades de pré-vitellogenèse (**figure 9C**, [p.130](#), **figure 10C**, [p.131](#)). La distribution a ainsi une étendue courte (« short ») alors que les individus sauvages possèdent une distribution plus étalée (« Long »). Un même type de tendance peut être observé en cours de vitellogenèse (**figure 9D**, [p.130](#), **figure 10D**, [p.131](#)), mais une plus grande proportion d'individus possède une dérégulation à ce stade qu'au précédent. En post-vitellogenèse, un grand nombre d'individus mutants ne possèdent pas de follicules correspondant au futur batch de ponte à T0, mais sont retrouvés plus fréquemment à T4 avec un nombre réduit de follicules composant ce pool dans plusieurs cas (**figure 9E**, [p.130](#), **figure 10E**, [p.131](#)). En comparant ces observations aux nombres d'œufs pondus en moyenne par chaque individu, il a été possible dans la majorité des cas d'obtenir une classe de phénotype (Strong, Mild, WT-like) cohérent avec la fécondité enregistrée et le type de dérégulation observée sur les profils de distribution (**figure 9F**, [p.130](#), **figure 10F**, [p.131](#)). Enfin, il est mis en évidence que l'addition de perturbations impactant les trois différents compartiments de croissance semble directement impacter la sévérité du phénotype de reproduction.

Pour conclure, les modifications majeures observées, à T0 ou à T4, confirment la capacité de la majorité des mutantes à former des follicules matures. Cependant, la formation de ce pool semble être affectée, plus ou moins fortement, par le contrôle de la distribution continue des follicules au sein de chaque compartiment. Il semble en effet que l'accumulation de follicules en pré-vitellogenèse impacte directement la constitution du pool vitellin, et induire les phénotypes les plus sévères. En revanche, la dérégulation seule de la formation du pool vitellin peut aussi être affectée et avoir des conséquences sur la ponte. Ainsi, il semble qu'il existe au moins deux mécanismes différents d'affectés chez ces mutantes à l'âge adulte : un impliquant la régulation de la formation du pool pré-vitellin, et un autre impliqué dans la régulation du passage de la croissance primaire à la croissance secondaire.

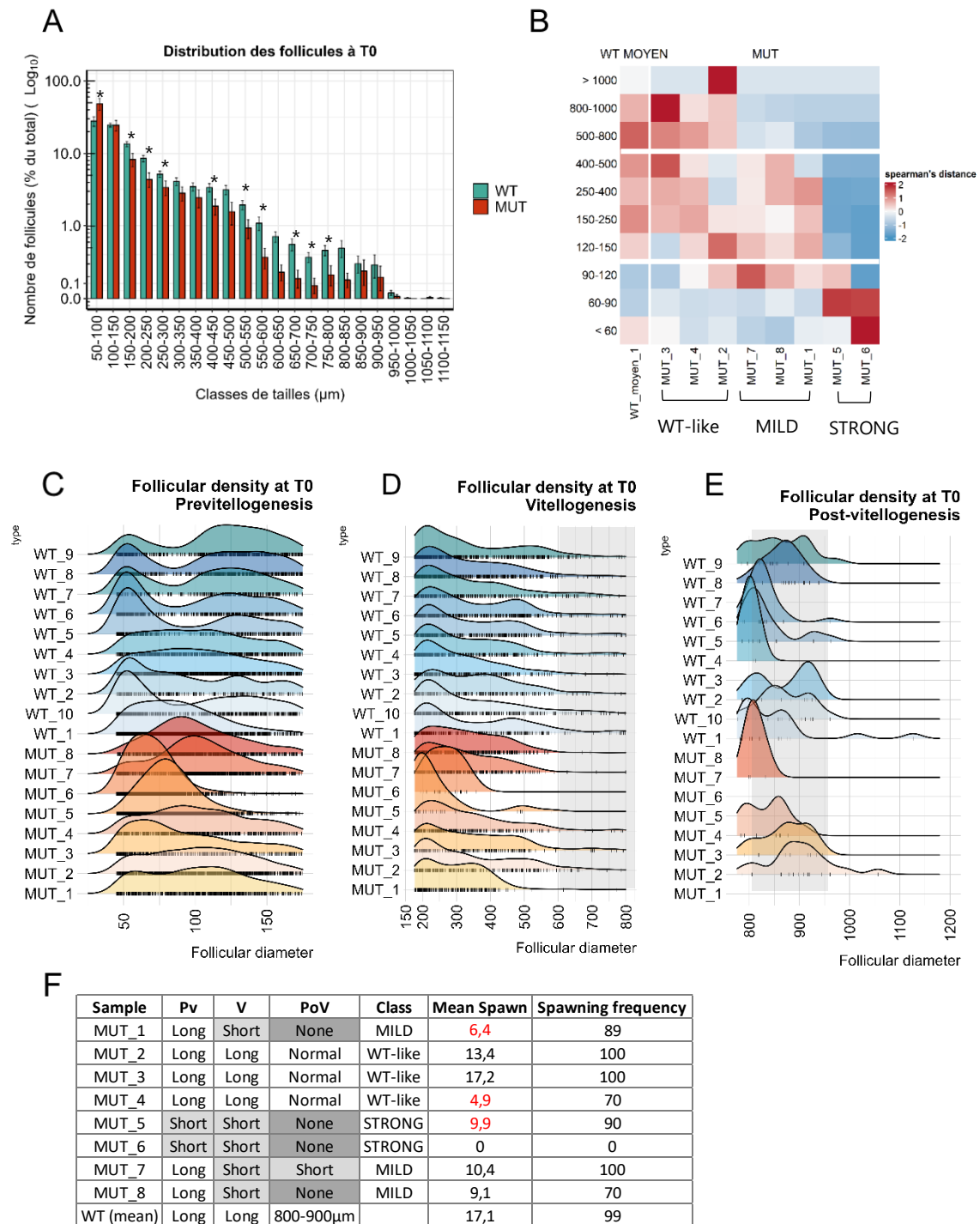


Figure 9 : Dynamique de folliculogenèse chez les femelles adultes *miR-202-KO* après la ponte (T0). (A) Distributions moyennes des follicules par classes de 50 µm de diamètre. (B) Variabilité des distributions de follicules par classe de taille selon les stades de l'ovogenèse et regroupement par types d'enrichissements. (C) Profils de densité folliculaire retrouvés en pré-vitellogenèse, en vitellogenèse (D) et en post-vitellogenèse (E). (F) Comparaison des dérégulations observées sur les profils, des regroupements par similarités et de la fécondité enregistrée avant prélèvement. Barres d'erreurs :sem. Test ; Kruskal-Wallis et post test de Dunn ($p < 0.05$).

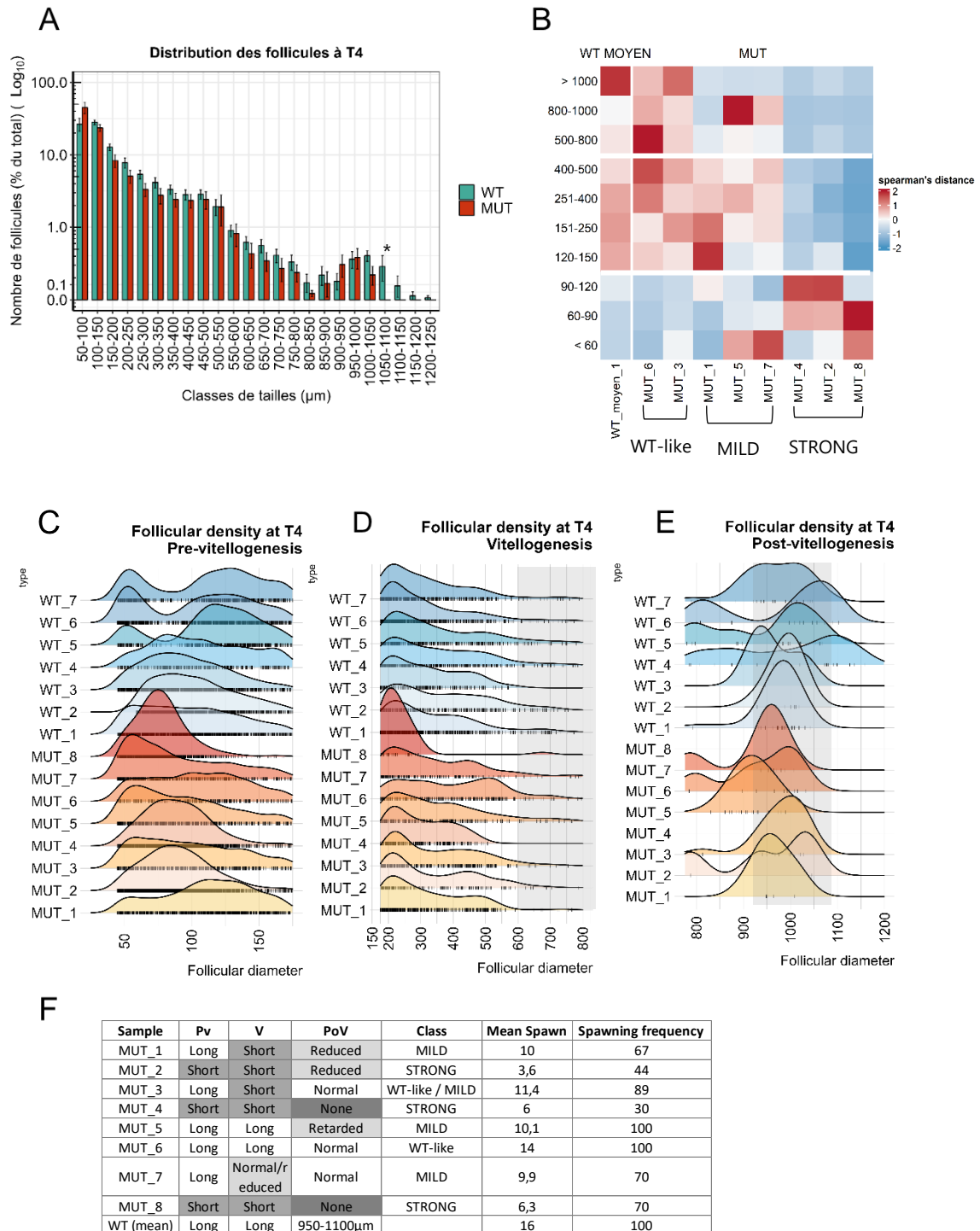


Figure 10 : Dynamique de folliculogénèse chez les femelles adultes *miR-202-KO* avant la ponte (T4). (A) Distributions moyennes des follicules par classes de 50 µm de diamètre. (B) Variabilité des distributions de follicules par classe de taille selon les stades de l'ovogenèse et regroupement par types d'enrichissements. (C) Profils de densité folliculaire retrouvés en pré-vitellogenèse, en vitellogenèse (D) et en post-vitellogenèse (E). (F) Comparaison des dérégulations observées sur les profils, des regroupements par similarités et de la fécondité enregistrée avant prélèvement. Barres d'erreurs :sem. Test ; Kruskal-Wallis et post test de Dunn ($p < 0.05$).

6. Synthèse des résultats

L'analyse du profil d'expression du miR-202 dans l'ovaire au cours du développement larvaire a permis de confirmer sa présence prédominante dans les cellules folliculaires entourant les ovocytes. Son niveau d'expression est détectable dès 15 jours post-éclosion et semble augmenter conjointement à la formation des follicules et de manière progressive. Malgré son expression précoce, il ne semble pas interagir significativement dans la régulation de la formation de l'ovaire larvaire, comme les larves *miR-202-KO* présentent des caractéristiques représentatives du développement similaires aux femelles sauvages (volume ovarien et densité de follicules). Comme la phase larvaire correspond à une période de mise en place des premiers follicules ovariens, l'analyse du contenu ovarien et du développement folliculaire à ce stade a permis d'évaluer le rôle du miR-202-5p dans la régulation des premières étapes de l'ovogenèse. L'analyse 3D de la distribution de follicules selon leur taille n'a pas révélé de défauts d'abondance de follicules aux premiers stades de pré-vitellogenèse ou de retard de développement, et l'analyse du taux de prolifération a confirmé le maintien d'un taux de croissance normal.

La poursuite de l'analyse du contenu ovarien des femelles *miR-202-KO* au stade juvénile a ensuite été réalisée, et a mis en évidence une dérégulation de la distribution folliculaire importante alors que le développement de l'ovaire ne présente, à une échelle globale, pas de modifications significatives. La précision et l'exhaustivité des mesures obtenues par la méthode 3D a permis de montrer une diminution de l'abondance relative de follicules précoces et une augmentation de follicules appartenant aux stades II et VI de l'ovogenèse. Différents patterns ont été observés chez les profils de distribution follicules en cours de pré-vitellogenèse et de vitellogenèse, dont un représentant peu de perturbation (*WT-like*) et deux représentant différents types de dérégulation : pic d'enrichissement supplémentaire/déplacé (*Shifted*) ou distribution étendue vers des stades plus avancés sans pic d'enrichissement (*Flattened*). Les patterns peuvent concerner les follicules appartenant aux stades de pré-vitellogenèse, de vitellogenèse et leurs différentes combinaisons semble définir trois classes de sévérité de phénotypes. Au cours de cette phase de croissance, le miR-202 semble ainsi avoir un rôle dans la régulation de la formation de la réserve immature et l'activation de la croissance secondaire.

Chez l'adulte en période de reproduction active, l'analyse conjointe de la fécondité, de l'abondance relative de chaque stade de l'ovogenèse et des profils brutes de densité folliculaire a mis en évidence, là aussi, un impact majeur du miR-202 à différents points de contrôle de l'ovogenèse. Les dérégulations de la croissance folliculaire se sont avérées plus complexes, avec diverses combinaisons de profils aux stades de pré-vitellogenèse, vitellogenèse et post-vitellogenèse. A l'inverse de la tendance à une croissance prématurée des follicules chez les juvéniles, il a été observé un retard ou une absence de développement des follicules dans chez de nombreux individus adultes. La combinaison des profils de dérégulation retrouvés dans chaque classe a pu prédire relativement bien la fécondité des individus lorsqu'ils sont prélevés environ 8h (T4) avant la ponte (7/8 femelles). La prédiction à T0 est moins fiable (5/8 femelles). De manière intéressante, des mutantes présentant une perturbation de fécondité comparable peuvent présenter une organisation ovarienne différente, voire normale dans un cas (individu 4 à T0). Ensemble, ces résultats semblent indiquer un rôle majeur du miR-202 dans le contrôle direct des rythmes de recrutements de

follicules en croissance primaire vers la croissance secondaire et plus ou moins directement le rythme de formation du batch de ponte.

DISCUSSION GENERALE

Précision des données obtenues

L'analyse exhaustive des contenus folliculaires des ovaires, et en particulier des mesures de diamètre, représente depuis longtemps un défi de taille notamment en raison de l'absence de méthodes efficaces d'imagerie 3D des tissus épais. Au cours de cette thèse, j'ai donc mis en place une méthode de transparence et de marquage des ovaires adultes (nommée C-ECi) permettant d'imager en 3D les ovaires adulte (d'une taille d'environ 8x8x5 mm). Cette méthode m'a permis de fournir les premières images 3D d'ovaires de poissons adultes pour l'analyse des contenus folliculaires. Cependant, il faut noter qu'un rétrécissement des ovaires a été observé suite au traitement des échantillons (délipidation, déshydratation). Ce défaut a donc été corrigé à posteriori en appliquant un facteur de correction ($\times 1.12$), estimé à partir de mesures de surfaces. Toutefois, notons qu'avec ce mode de calcul le rétrécissement est considéré comme isotrope et identique quel que soit la taille des follicules, ce qui a déjà été évalué comme tel par Iwamatsu et al. lorsqu'un tissu est immergé dans des solvants organiques (Takashi Iwamatsu 1988). Cependant, seule une analyse systématique du rétrécissement des follicules stade par stade permettrait réellement de s'assurer de l'isotropie de ce phénomène.

Un autre point d'attention peut être porté sur les méthodes d'analyses d'images réalisées qui restent une étape importante à considérer dans l'évaluation de la qualité des données. Au cours de cette thèse, j'ai développé un pipeline dédié à l'analyse automatique des images 3D d'ovaires adultes et larvaires. Ce pipeline est basé sur l'utilisation d'un algorithme très récent de deep-learning (Cellpose, (Stringer et al. 2021)), conçu pour la segmentation de nombreux types de cellules. L'utilisation de cet algorithme pré-entraîné généraliste a permis de réaliser une segmentation des follicules adultes d'une qualité incomparablement meilleure qu'avec les méthodes traditionnelles. Plus remarquable encore, il a permis de segmenter avec succès des images d'ovaires de larves présentant un très faible signal fluorescent, inexploitable avec les méthodes conventionnelles. Ce pipeline est à ce jour la première application utilisant des solutions d'apprentissage profond pour l'analyse d'images 3D de l'ovaire chez les vertébrés. Au vu des résultats obtenus avec ces nouvelles approches de deep-learning, on peut donc aujourd'hui remettre en question le dogme selon lequel une bonne image brute est un prérequis indispensable pour une segmentation précise des objets, et ainsi suspecter pour l'avenir un accroissement considérable des possibilités d'analyse.

Cependant, malgré sa grande efficacité, il convient de noter qu'il existe encore quelques imprécisions qui n'ont pu être corrigées. Des sous-segmentations ou des objets non segmentés ont parfois été détectés, principalement avec les images d'ovaires de larves. Pour cette raison, nous avons fixé un seuil de précision à 40 μm de diamètre, pour les images d'ovaires adultes (fluorescence de contours) et à 25 μm de diamètre pour les images d'ovaires de larves (fluorescence intra-ovocytaire). Bien que mineures, ces erreurs se produisent dans des régions très denses en ovocytes ou avec des niveaux de signal sub-optimaux. Cette observation est en accord avec certaines études qui ne recommandent pas Cellpose pour les zones de forte densité d'objets, ainsi que pour les images surexposées ou sous-exposées (Kar et al. 2021), probablement attribué au processus de moyennage 2D de l'extension 3D de Cellpose qui reste très certainement moins précis qu'un modèle entraîné avec des données 3D (Lalit, Tomancak, et

Jug 2021; Stringer et al. 2021). Ainsi, la précision des mesures pourrait très probablement être accrue avec la génération d'un modèle spécialement dédié, et en particulier avec un modèle entraîné en 3D sur nos données corrigées, comme l'a montré D.Eschweiler et al (Eschweiler, Smith, et Stegmaier 2022). Il serait donc intéressant à l'avenir d'utiliser nos résultats de segmentation corrigés pour affiner l'algorithme Cellpose, ce qui est possible depuis peu avec la nouvelle version de Cellpose (Cellpose v2). Une solution complémentaire pourrait consister à améliorer la qualité des images d'entrée, en utilisant un marqueur d'ovocyte approprié pour limiter les étapes de pré-traitement du signal de fluorescence et idéalement en combinaison avec un marqueur membranaire pour une meilleure discrimination des contours. En l'absence de tel marquages, une alternative pourrait être l'utilisation d'un autre processus de débruitage que celui que nous avons utilisé (Noise2Void), en utilisant par exemple cette fois-ci des images appariées bruyantes/non bruyantes (CARE), ou encore combinant un processus de déconvolution (DecoNoising) (Weigert et al., 2018 ; (Goncharova et al. 2020)).

Régulation de la formation et la croissance des follicules au cours du cycle de vie

1. La phase de reproduction active entraîne une perte progressive du stock de follicules

Chez les poissons téléostéens, en particulier chez les espèces à reproduction itéropares, il a été montré que les follicules pouvaient être nouvellement formés chez des individus matures, à l'inverse des mammifères où il est plus généralement accepté que l'activité *de novo* est limitée au développement précoce des individus (Kagawa 2013; Wildner, Grier, et Quagio-Grassiotto 2013). Malgré quelques études démontrant cette capacité dans des expériences d'ablation ou de clonages (Cao, Mao, et Luo 2019; S. Nakamura et al. 2010; Shuhei Nakamura et al. 2011), il subsiste peu de compréhension de son activité réelle en conditions physiologiques. Dans les travaux présentés ici, la quantification du nombre total de follicules contenus dans les ovaires à différentes étapes du développement et de la période de reproduction active permet, pour la première fois chez le médaka, d'évaluer la cinétique de croissance de l'ovaire de manière exhaustive.

Pendant toute la phase de croissance, l'augmentation du nombre de follicules formés correspond à une production de 30 à 50 follicules par jour (environ +4000 pour 100 jours post-fécondation). En revanche, la diminution progressive du nombre de follicules lors de la période de reproduction semble refléter la perte de 15 à 20 follicules par jour, ce qui correspond au nombre d'œufs contenu dans une ponte relativement normale. Les pontes journalières peuvent parfois contenir jusqu'à 40 follicules, aussi la perte progressive de follicules peut être inférieure au nombre d'œufs total pondus. Il ainsi est possible qu'une activité de néo-ovogenèse persiste chez l'adulte mature, de l'ordre d'une quinzaine de follicules par jour, mais ne suffise pas à maintenir un équilibre total au cours des trois premiers mois de ponte. Ceci pourrait être expliqué par un rythme de mitoses non synchronisé avec le rythme de ponte de 24h, comme il a été montré par une étude estimant la durée du cycle de division des cellules germinales entre 33 et 37 heures (S. Nakamura et al. 2010). De plus, la capacité de ponte n'est pas impactée dans les 3 mois suivant un traitement inhibiteur de la prolifération des cellules germinales souches (appliqué à l'âge de 3-4 mois), ce qui soutient le rôle majeur de la néo-ovogenèse au cours de la formation de l'ovaire jusqu'à maturité, mais dispensable pour la production d'œufs dans la première période de reproduction après une phase de croissance normale (S. Nakamura et al. 2010). La qualité et quantité d'œufs pondus n'a toutefois pas été rapportée dans cette expérience.

Une autre possibilité serait toutefois que la perte progressive de follicules soit due à un taux d'atrésie, comme il a été montré chez le médaka où environ 6% d'atrésie a été estimé par des comptages sur coupes, majoritairement détectée parmi les follicules vitellins (Sayed, Ismail, et Mitani 2018). Cette étude ne précise cependant pas la période du cycle de ponte étudiée, alors que l'atrésie semble être particulièrement retrouvée en phase de régression après la ponte chez plusieurs espèces de téléostéens (Corriero et al. 2021). Une autre étude a

estimé le nombre de follicules dégénératifs après la ponte entre 25 et 40 follicules, par comptages sur coupes histologiques également (Yamamoto et Yoshioka 1964). En revanche, le nombre de larges ovocytes peut être sur-représenté sur coupes (probabilité d'encombrement) et le niveau d'atrésie pourrait ainsi être biaisé par la sur-représentation des follicules aux stades les plus affectés par l'atrésie folliculaire (follicules vitellins). Enfin, une des caractéristiques majeures indiquant des grades sévères d'atrésie, l'hyperplasie des cellules folliculaires, n'a pas été observée sur nos images. D'autres caractéristiques de l'atrésie sont toutefois non identifiables sur nos images fluorescentes comme par exemple l'aspect du vitellus.

D'autres expériences seraient nécessaires pour déterminer la provenance exacte de cette différence de nombre de follicules. D'une part, les échantillons utilisés dans ces travaux pourraient être réutilisés pour la quantification des follicules atrétiques par une approche histopathologique sur coupes sériées H&E (Johnson, Wolf, et Braunbeck 2009), éventuellement facilitée par un algorithme de deep-learning entraîné à la classification des follicules. Cette méthode a en effet déjà fait ses preuves sur des coupes d'ovaires de souris (Sonigo et al. 2018). Une étude récente suggère également la possibilité de détecter les stades tardifs d'atrésie par l'observation simple de l'autofluorescence produite par l'accumulation de lipofuscines au cours de ce processus (Medina et al. 2021). D'autre part, l'analyse du taux de production de nouveaux follicules et de son évolution au cours du développement pourrait être réalisée par une approche d'imagerie similaire, incluant des marqueurs spécifiques de germinal cradles (*sox9*) et des cellules germinales en cours de division (*nanos2*, *foxl3*, *sycp3*). Une récente étude utilisant des méthodes de microscopie permettant de détecter les niches germinales et des marqueurs de division a d'ailleurs mis en évidence deux types d'activité de prolifération d'ovogonies différentes entre la sardine et l'anchois selon le moment du cycle de reproduction (en développement/actif/en récupération) (Charitonidou, K., Panteris, E. et Ganiats, K., 2022).

2. La formation du stock folliculaire global ne semble pas régulée par le miR-202

L'activité de néo-formation de follicules à partir des cellules germinales semble être un mécanisme particulièrement important pendant toute la période de développement de l'ovaire, mais son rôle a aussi été montré dans la capacité de régénération en cas de perte majeure des tissus ovariens (Cao, Mao, et Luo 2019; S. Nakamura et al. 2010). Chez les mutantes *miR-202*, une diminution de l'expression de *foxl3* a été détectée au stade juvénile, suggérant un nombre réduit de cellules germinales mitotiquement actives (Gay et al. 2018). Pourtant, nos analyses aux stades larvaires, juvéniles et adultes n'ont pas mis en évidence de différence de nombre total de follicules, et aucune expansion évidente des tissus spermatiques n'a été observée. En effet, la mutation de *foxl3* n'empêche pas complètement la formation de follicules normaux, mais une induction de spermatogenèse dans l'épithélium germinal qui s'étend alors dans l'ovaire chez l'adulte et une diminution de la fécondité des femelles (Nishimura et al. 2015; Nishimura, Nakamura, et Tanaka 2016). La baisse d'expression de *foxl3* observée par Gay et al pourrait ainsi provenir d'une inhibition tardive de la prolifération des cellules germinales au cours du développement, mais ne

semble pas liée directement à la formation du phénotype mutant par une dérégulation de la formation de nouveaux follicules. Une hypothèse serait que l'accumulation de follicules pré-vitellins inhibe la formation de nouveaux follicules à partir du germinal cradle. Il a été suggéré en effet que *Gsdf*, exprimé notamment dans les cellules somatiques des follicules pré-vitellins et celles entourant les ovocytes en méiose (Gautier, Le Gac, et Lareyre 2011), aurait un rôle dans la régulation de la prolifération des cellules germinales, causant une hyperplasie lorsqu'il est invalidé (Wu et al. 2019). La diminution de l'expression de *Gsdf* a aussi été observée chez les *miR-202*-KO (Gay et al. 2018), mais pourrait être augmenté dans le germinal cradle et diminué dans les follicules pré-vitellins qui sont vraisemblablement plus nombreux.

Néanmoins, un individu extrême a toutefois été observé au stade juvénile comportant un nombre de follicules particulièrement bas, et un deuxième individu, non analysé par microscopie, possédait un ovaire semblant être vide (seule une membrane a pu être observée au microscope). Un tel phénotype n'a pas été observé chez les femelles adultes. Les capacités de proliférations des cellules germinales ne semblent ainsi pas impactées dans la majeure partie des cas, mais des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre l'impact du *miR-202* sur les mécanismes de division des cellules germinales et la formation des follicules. Nos méthodes d'imagerie et d'analyse n'ont en effet pas permis d'étudier directement le pool de cellules germinales mais pourraient être adaptées en termes de résolution ou de marquages fluorescents afin d'explorer l'activité des germinal cradles et leur nombre chez des femelles de différents âges, mais aussi chez les mutantes *miR-202*. Le nombre drastiquement réduit de follicules pourrait toutefois aussi être directement lié à des mécanismes d'apoptose ou d'atrésie de manière précoce, comme il est souvent observé lors de dérégulations physiologiques (Corriero et al. 2021; K. Ganas, Nunes, et Stratoudakis 2008; Lubzens et al. 2010).

3. La mise en place de l'asynchronie de croissance folliculaire est nettement contrôlée dans le temps et dépend de la photopériode

L'ovaire du médaka est régulièrement qualifié comme « asynchrone » car présentant une large variété de follicules couvrant l'ensemble des stades de l'ovogenèse (Yamamoto et Yoshioka 1964; Gay et al. 2018; T. Iwamatsu 1978; Wallace et Selman 1981). Cette classification, toutefois, semble avoir été basée sur l'observation de la présence des stades de l'ovogenèse mais rarement sur des données quantitatives permettant d'évaluer les proportions relatives de chaque stade et la possible prédominance de l'un d'eux. De plus, le mécanisme de mise en place de cette distribution de follicules de tailles variées reste mal connu en raison d'un nombre faible d'études quantitatives, en particulier entre les stades embryonnaire et adulte.

3.1 La période de croissance sous photopériode courte entraîne une accumulation de follicules relativement synchronisés

Nos analyses ont montré que l'ovaire se développe d'abord de manière globalement synchronisée au cours de la phase de croissance. Jusqu'à trois mois post-fécondation, les ovaires contiennent en effet une large majorité de follicules inférieurs à 100 μm (stades I, II) de diamètre et un faible taux de follicules se développe au-delà, ne dépassant pas 250 μm de diamètre (stade IV). Bien que l'immaturité ovarienne ait été auparavant décrite par la prédominance de follicules pré-vitellins dans l'ovaire (Johnson, Wolf, et Braunbeck 2009; Takashi Iwamatsu 2015), l'abondance relative des différents stades n'avait encore été décrite précisément que très rarement chez le médaka (Yamamoto et Yoshioka 1964; Takashi Iwamatsu 2015; Gay et al. 2018). Ces résultats sont cohérents avec les profils de distribution décrits sur coupes par Gay et al, où un nombre supérieur de petits follicules a été détecté à un âge similaire (Gay et al. 2018). Cependant, une autre étude a réalisé les profils de distribution de follicules au sein de l'ovaire en cours de développement, mais semble décrire une croissance folliculaire plus avancée chez des poissons de tailles similaires. A une taille de 1.4cm, correspondant dans notre analyse à des larves de 30 jours post-fécondation, les auteurs décrivent la première apparition de follicules de stade V (Takashi Iwamatsu 2015). Les auteurs n'ont pas rapporté d'âges post-fécondation correspondants, mais ont aussi utilisé des conditions d'élevages largement différentes avec une densité très faible de poissons par bacs (5 pour 60L) et une photopériode de reproduction (jours longs) appliquée dès l'éclosion des larves. Ainsi, même si le développement ovarien semble corrélé au taux de croissance des poissons, la densité et la photopériode semble largement affecter le développement folliculaire observable chez des poissons de même longueur. Même avec de telles différences, les auteurs montrent toutefois que les follicules de stade I et II restent particulièrement abondants indépendamment de la taille des poissons (jusqu'à 2 cm), et nos résultats montrent que cette distribution persiste jusqu'à 3 mois post-fécondation.

3.2 L'organisation de l'ovaire devient fortement asynchrone avec la poursuite de la vitellogénèse sous une photopériode longue

A la différence des travaux d'Iwamatsu (Takashi Iwamatsu 2015) ne conservant qu'une photopériode longue, nos résultats indiquent clairement une modification majeure des profils de distribution à partir du changement de photopériode de croissance (courte) vers la reproduction (longue). Les profils montrent une augmentation rapide de l'abondance des follicules en seconde phase de pré-vitellogénèse et en cours de vitellogénèse, et particulièrement l'apparition de follicules au-delà du stade V. Ce dernier événement marque l'apparition de la fonction active de stéroïdogénèse des follicules, alors capables de produire du 17- β -oestradiol (Takashi Iwamatsu 1988). L'importance de la photopériode longue pour la vitellogénèse et la mise en place de la fécondité mise en évidence dans nos analyses confirme notamment une autre expérience montrant une dégradation rapide de la capacité des follicules à poursuivre leur croissance après un raccourcissement soudain de la photopériode à 8h de jour/16h de nuit (Koger, Teh, et Hinton 1999). Ils sont également cohérents avec les observations rapportées au cours des changements saisonniers du contenu ovarien (Yamamoto et Yoshioka 1964).

Dans cette dernière étude, il est décrit une absence de stades de vitellogenèse pendant la période de septembre à février, puis l'apparition de croissance secondaire et tertiaire pendant les mois de mars à mai. Nos travaux, sous une photopériode artificielle, reproduisent également globalement une même tendance.

3.3 Mise en place progressive de la capacité de ponte optimale

Une large majorité des follicules persiste encore au stade de pré-vitellogenèse durant la première semaine de transfert en reproduction, alors qu'après plusieurs semaines de pontes, un équilibre tend à s'installer entre les compartiments contenant les stades de pré-vitellogenèse et de vitellogenèse. De plus, les profils particulièrement similaires de distribution de follicules au début et à la fin de la semaine de transfert en photopériode de reproduction mettent en évidence un processus d'enrichissement relativement faible/lent de follicules dans les compartiments de croissance secondaire comparé aux modifications observables dans les premiers jours après transition en reproduction. Une étude a auparavant estimé la durée de la croissance entre 500-700 et 950 μm de diamètre à environ 48h (Sakai et al. 1987; Naruse, Tanaka, et Takeda 2011). Nos résultats montrent que la proportion de follicules en phase précoce de vitellogenèse, avant transfert en reproduction (Juvénile), est comparable à la proportion en vitellogenèse tardive après deux jours en photopériode de reproduction, suggérant ainsi également une durée d'environ 48h pour la croissance entre la vitellogenèse précoce et tardive. Le taux de croissance des follicules vitellins semble ainsi être stable au cours du temps.

Enfin, les femelles commencent à pondre très faiblement après 2 jours en reproduction, puis plus régulièrement seulement à la fin de la semaine de transfert, avec des pontes possédant toutefois un nombre réduit d'œufs. Ceci met en évidence un déplacement progressif des follicules vers la croissance secondaire, et impliquant relativement peu de follicules recrutés en même temps d'un compartiment à l'autre, mais de manière régulière. Les compartiments sont ainsi lentement enrichis mais la ponte est permise dès l'atteinte d'un nombre suffisant de follicules dans les compartiments de vitellogenèse tardive, et semble ainsi être plus fournie dès lors que l'enrichissement de tous les stades de vitellogenèse est plus élevé. Ces observations permettent la mise en évidence d'un cycle dynamique stable impliquant un taux de croissance relativement stable et un recrutement régulier de follicules en croissances mais d'un nombre réduit, n'entraînant ainsi qu'une accumulation lente de chaque compartiment. Cette dynamique, responsable de l'aspect asynchrone de l'ovaire de médaka, semble ainsi particulièrement importante dans la mise en place du rythme de ponte régulier possédant un nombre stable d'œufs. En effet, à chaque ponte, comme l'ont montré les analyses de distribution au cours de 24 heures, le compartiment de post-vitellogenèse est « vidé », mais il subsiste toujours un nombre proche d'une vingtaine de follicules entre 800 et 950 μm , vraisemblablement destiné au prochain batch. Ainsi, la fécondité par batch semble pouvoir être directement prédite par l'abondance relative du pool de follicules au stade IX de l'ovogenèse chez le médaka, dès l'heure suivant la précédente ponte.

Dynamique de recrutement et conséquences sur la fécondité

La dynamique de l'ovogenèse est rythmée par la durée de croissance au sein de différents compartiments, mais également par le recrutement « actif » de follicules vers un stade de croissance plus avancé (Kostas Ganias et Lowerre-Barbieri 2018). En effet, plusieurs études ont démontré l'existence de pools folliculaires agissant comme réserve à l'origine d'un nombre, déterminé ou non, de follicules destinés à être pondus au cours d'une saison (Serrat et al. 2019; Mouchlianitis, Minos, et Ganias 2020; O. S. Kjesbu et Holm 1994; dos Santos Schmidt et al. 2021). Alors que certains auteurs identifient cette réserve à un stade de la vitellogenèse, d'autres ont récemment mis en évidence la constitution d'un pool de réserve au cours de la pré-vitellogenèse (Brown-Peterson et al. 2011; Heins et Brown-Peterson 2022; Olav S. Kjesbu, Thorsen, et Fonn 2011; Serrat et al. 2019). Chez les poissons dits « asynchrones », la mise en évidence de telles réserves se veut difficile en raison d'une distribution folliculaire continue et ne présentant pas de différences d'enrichissement facilement distinguables. Un recrutement peut toutefois logiquement être suggéré lorsqu'une diminution de l'abondance d'un pool semble directement suivie par l'augmentation de l'abondance de follicules de stades plus avancés. Grâce à l'analyse de la distribution folliculaire à de nombreux points temporels du cycle de vie du médaka et d'un cycle de reproduction unique, nos travaux ont identifié différents types de recrutements chez le médaka permettant de mieux comprendre de quelle dynamique dépend la fécondité du médaka.

1. Formation cyclique du batch de ponte à intervalle court et sa régulation précise dans le temps

1.1 Rythme de recrutement du batch de ponte

Chez le médaka, une attention particulière a été portée sur l'étude de la formation du batch journalier de ponte (Wallace et Selman 1981; T. Iwamatsu 1978; T. Takahashi et al. 2013). Nos résultats d'analyses au cours d'un cycle de 24 heures sont cohérents avec les travaux précédents identifiant un « décrochage » d'un pool de follicules matures dans les 8-12 heures qui précèdent la ponte (T. Iwamatsu 1978). Différentes études ont montré que des follicules mesurant plus de 800- 900 μm de diamètre, selon le moment du cycle auquel a lieu le prélèvement, sont capables de réaliser leur maturation et ovulation *in vitro* de manière spontanée (T. Iwamatsu 1978; Sakai et al. 1987), révélant ainsi un mécanisme d'activation précisément contrôlé dans le temps. Le rôle de la gonadotropine LH dans le processus de maturation et d'ovulation est aujourd'hui relativement bien démontré chez le poisson et certaines études ont pu déterminer temporellement son activité. Alors que les niveaux d'expression de *lhb* augmentent particulièrement une heure avant et après l'ovulation dans l'hypophyse, son action sur les follicules pré-ovulatoires serait retardée jusqu'à 19-15h avant la prochaine ovulation (Ogiwara et al. 2013). Ces observations coïncident avec

celles d'Iwamatsu (T. Iwamatsu 1978), et correspondrait à la période entre les prélèvements T1 et T2 dans notre étude (-20 à -16 heures avant ovulation). A cette période, la majorité des follicules en post-vitellogenèse mesurent moins de 950 μm . L'ensemble de ces résultats confirme que le décrochage du pool $> 950 \mu\text{m}$ correspond à un recrutement du batch sous l'influence des facteurs de maturation et des gonadotropines.

1.2 Le rôle du miR-202 déterminant pour la fécondité serait en amont du recrutement du batch

Chez les mutants *miR-202*, la formation du batch de ponte ne semble pas provenir d'une dérégulation de l'activation dépendante de la LH, comme la plupart des femelles possèdent des follicules mesurant plus de 950 μm de diamètre 8 heures avant la ponte. En revanche, un nombre plus important possède une distribution folliculaire en vitellogenèse plus « courte », diminuant ainsi la quantité de follicules capables d'être recrutés. Comme nous l'avons vu dans la mise en place des pontes « normales » pendant le transfert en reproduction, l'abondance suffisante du compartiment de vitellogenèse tardive peut influencer largement la capacité à produire une ponte, mais aussi la quantité d'œufs pondus simultanément. Il paraît ainsi cohérent que la baisse de fécondité chez les mutantes soit liée directement à la dérégulation de la continuité de distribution folliculaire au sein de tous les compartiments de croissance secondaire, plutôt qu'à une dérégulation directe du processus de recrutement du batch de ponte. Il serait intéressant, pour confirmer cette hypothèse, d'isoler les follicules pré-ovulatoires, après la période déterminante de l'activation de la maturation par la LH, et de comparer les taux de follicules en capacité d'effectuer la GVBD et l'ovulation, avec ou sans stimulation hormonale/gonadotrope externe chez les femelles *miR-202-KO* ou sauvages.

2. Deux points de recrutement distincts chez la femelle immature et en cours de reproduction

2.1 Activation de la croissance folliculaire ou levée de dormance

Alors que l'organisation ovarienne en cours de croissance a été peu décrite en termes quantitatifs, notre analyse réalisée entre deux stades larvaires et le stade juvénile juste avant transfert en reproduction a permis la mise en évidence d'un recrutement massif de follicules lors de cette phase immature. En effet, les stades larvaires présentent essentiellement une phase d'accumulation de follicules au stade I de l'ovogenèse, mais nous avons observé un décalage majeur vers le stade II chez la femelle juvénile.

Ce fort enrichissement de follicules de stade II semble représenter une activation de la croissance folliculaire à l'approche de la maturité des femelles. Ce processus, plus étudié chez les mammifères, a été aussi quelques fois décrits chez les téléostéens et consisterait en une transition vers les follicules primaires (*perinucleolus stage*) via une

sortie de l'état de dormance des follicules primordiaux (*chromatin-nucleolus stage*) (S.-C. Lee et Lou 2019). La régulation de l'état de quiescence des follicules est particulièrement importante chez les espèces ayant un nombre déterminé de gamètes formés au cours du développement. Chez le médaka et les poissons en général, ce mécanisme et son importance dans le maintien de la fécondité dans le temps reste mal connu. Chez les mammifères, le maintien de la quiescence ovocytaire et son activation au bon moment est particulièrement important pour le maintien de la fertilité et la dérégulation du maintien de ce pool peut conduire à un épuisement du stock ovocytaire comme dans les cas de POF (premature ovarian failure) (Kezele et Skinner 2003; Reddy et al. 2008; Skinner 2005). Ici, nous mettons en évidence que cette transition est particulièrement marquée entre le dernier stade larvaire étudié (40jpf) et la première semaine en période de reproduction (Transfert). Cette activation semble toutefois se poursuivre, dans une moindre mesure, chez la femelle en reproduction active dans les deux premiers mois de ponte et diminuer voire s'arrêter après 3 mois de ponte. Cette dernière observation est intéressante car la durée de 3 mois correspond à celle où les femelles privées de renouvellement de cellules germinales peuvent rester fertiles, devenant ensuite stériles par l'épuisement des follicules du compartiment stromal (S. Nakamura et al. 2010). Ainsi, il semble que la levée de quiescence observée puisse déterminer la fécondité des femelles jusqu'à 3 mois de ponte. Le nombre absolu maximal de follicules au stade I étant atteint au stade juvénile, cela pourrait impliquer la possibilité que la fécondité optimale des femelles médaka soit initialement déterminée pour une saison de reproduction, durant en théorie 3-4 mois en conditions naturelles (Awaji et Hanyu 1987). Les données recueillies dans notre étude seraient cohérentes notamment avec la possibilité de 4 mois de ponte d'environ 20 œufs par jours à partir du pool de stade I moyen observé chez les juvéniles (2500 follicules). De plus, la dérégulation de l'activation de la croissance primaire chez les mutantes *miR-202* semble être en faveur d'un rôle important du contrôle de cette activation dans le temps pour le maintien de la fécondité.

Pour confirmer une telle hypothèse, il serait particulièrement intéressant d'analyser le contenu ovarien de femelles ayant eu une période de croissance réduite (photopériode, densité, nourrissage) et d'évaluer si une diminution de la fécondité apparaît précocement, ou si une activité du germinal cradle est supérieure chez ces femelles après une période donnée. De même, la mesure de l'activité du germinale cradle à différents temps de la période de reproduction active permettrait de détecter si un renouvellement intense a lieu après plusieurs mois de ponte, ou s'il est actif mais relativement faible, conduisant à la poursuite de la ponte mais de manière moins fréquente/moins optimale. Au cours des derniers mois de ces travaux de thèses, des échantillons de femelles plus âgées ont commencé à être analysés, et pourraient permettre d'observer s'il y a effectivement un épuisement de ce pool de follicules primordiaux ainsi que les conséquences sur la fécondité au cours du temps. L'analyse de femelles mutantes *miR-202* à des stades plus âgés permettra également d'évaluer l'impact d'une activation trop précoce de la croissance des follicules, avec un possible épuisement prématuré du stock ovarien.

2.2 Un second recrutement effectue la transition entre la croissance primaire et secondaire

Après la levée de dormance des follicules quiescents, les ovocytes subissent des modifications morphologiques, transcriptionnelles et fonctionnelles. La croissance primaire, ou pré-vitellogenèse, est notamment

marquée par une activité de formation d'organelles dans les ovocytes, le développement des cellules somatiques et leurs jonctions ou encore la formation du chorion et de ses villosités (Takashi Iwamatsu 1988; Kagawa 2013). La croissance secondaire représente un processus nécessitant un apport énergétique particulièrement important, avec une activité de production de protéines importante, une internalisation de phospholipides, la différenciation cellulaire et le développement de la capacité de stéroïdogenèse et de nombreux autres processus (Takashi Iwamatsu 1988; Kagawa 2013; Jalabert 2005; Lubzens et al. 2010). C'est donc une étape majeure de l'ovogenèse et la transition entre ces deux phases de croissances a un impact important sur l'acquisition des fonctions reproductrices et le taux de fécondité.

Dans notre étude, nous avons montré que cette transition apparaissait nettement à l'approche de la maturité, lors du transfert en photopériode de reproduction, bien qu'un nombre très faible de follicules commencent à croître au-delà de 150 μm dès le stade juvénile. Chez le médaka, aucune étude connue à ce jour n'a décrit précisément le rythme et l'ampleur du recrutement des follicules au cours de la période de reproduction. Au cours d'un cycle unique de ponte, nos résultats mettent en évidence un équilibre stable des compartiments de croissance primaire et secondaire dans le temps, alors que le batch de ponte se démarque rapidement. Ceci suggère que le nombre de follicules recrutés dans les compartiments est équivalent au nombre de follicules constituant le batch de ponte. Ces résultats sont similaires à ceux d'une autre étude récente identifiant un équilibre de la distribution au cours d'une ponte chez une espèce à fécondation de type « indéterminée » (Mouchlianitis, Minos, et Gantias 2020). De plus, l'absence de variation dans un compartiment particulier suggère la présence de deux recrutements, un premier qui alimente la pré-vitellogenèse que nous identifions entre le stade I et II, puis un second marquant le passage entre la pré-vitellogenèse et la vitellogenèse.

Ici, nous avons montré que cette deuxième transition correspond à un point d'enrichissement de follicules de tailles relativement synchronisés autour de 120 μm . Ce pool de follicules correspond en effet remarquablement à un point stable autour duquel l'abondance des follicules varie durant toute la période de reproduction étudiée. En effet, les stades I, II et III (<60-120 μm) voient leur contenu s'abaisser progressivement avec la maturité de ponte, tandis que tous les stades suivants comportent un plus grand nombre de follicules avec le temps. Il semble ainsi que la transition entre le stade III et IV marque particulièrement le passage de la croissance primaire à la croissance secondaire. Comme discuté précédemment, la fécondité optimale semble être mise en place lorsqu'une balance précise entre ces deux compartiments est atteinte. L'intensité (nombre de follicules recrutés) et la fréquence de recrutement semble ainsi contrôler largement la bonne répartition de l'abondance des follicules dans tous les stades de vitellogenèse afin d'approvisionner correctement les batch de pontes successifs, comme il a été observable chez les mutantes *miR-202*.

Nos analyses mettent en évidence l'importance de la notion temporelle pour identifier les recrutements à l'œuvre chez une espèce de type asynchrone. Comme il a été suggéré par Gantias et al. (Kostas Gantias et Lowerre-Barbieri 2018), le simple « snapshot » à un temps donné de la période de reproduction ne nous a pas permis d'identifier précisément les recrutements à l'œuvre chez le médaka, à l'exception du batch de ponte. Selon les modèles de Gantias, nos résultats semblent décrire un modèle de recrutement présentant un court intervalle de

ponte, un recrutement en croissance secondaire multiple au cours de la période de reproduction et un recrutement non restreint, typique d'une fécondité indéterminée pour une saison. Cependant, comme discuté auparavant, il serait finalement possible que la fécondité soit déterminée à un stade antérieur à la croissance primaire, dès la formation du pool de follicules de stade I chez la femelle juvénile. Nos données suggèrent en effet que ce pool folliculaire est fortement épuisé après deux à trois mois de ponte. Dans ce modèle, plutôt que de considérer le recrutement en croissance secondaire pour la détermination de la fécondité, ce serait ainsi plutôt le recrutement des follicules primordiaux vers la croissance primaire qui pourrait être utilisé comme prédicteur de la fécondité totale d'une saison de reproduction. D'autres analyses complémentaires, utilisant une méthode plus précise de détection des follicules de stade I chez les adultes, seraient toutefois nécessaires pour écarter un biais de mesure lié à une taille minimale de follicules détectés différentes entre les ovaires juvéniles et adultes en raison notamment d'une résolution d'image différente. Cependant, une baisse du nombre de follicules de stades I est nettement détectée entre les ovaires au temps de transfert et adulte, à partir de l'analyse d'images de résolution identiques. Pour confirmer une telle hypothèse, la modélisation de la dynamique ovarienne, basée sur les données produites dans nos travaux, serait particulièrement intéressante. La modélisation mathématique permettrait en effet, grâce à l'intégration de toutes ces données (distribution par rapport à l'âge, fécondité, taux de croissance), de tester l'hypothèse de stock déterminé primordial et d'évaluer si la fécondité totale sur la période de reproduction est cohérente. Dans ce but, l'ajout d'un point d'analyse à un âge plus avancé, proche de l'arrêt de la capacité de ponte des femelles, serait notamment indispensable pour mieux évaluer les prédictions du modèle. De plus, la période de reproduction active sous conditions artificielles pouvant être prolongée par rapport aux cycles naturels du médaka, il serait intéressant d'évaluer l'évolution du contenu ovarien après un retour à une photopériode courte de manière à simuler une saison reproductive normale.

3. Le miR-202 est impliqué dans la régulation des recrutements de follicules en croissance primaire et secondaire

L'importance majeure des différents recrutements identifiés est particulièrement bien illustrée par les perturbations observées chez les femelles mutantes *miR-202*. La baisse de fécondité décrite chez cette lignée auparavant par Gay et al semble en effet être directement liée à la dérégulation de la dynamique de recrutement à différentes étapes de la croissance folliculaire. En plus d'aider à la compréhension de la régulation de la dynamique de l'ovogenèse et comment elle impacte la fécondité, les résultats des analyses de cette lignée permettent de mieux appréhender le rôle et le mécanisme d'action du miR-202.

L'analyse de la distribution folliculaire chez les femelles juvéniles mutantes *miR-202* a mis en évidence une diminution plus intense du nombre de follicules de stade I et une augmentation en parallèle de l'abondance des follicules de stade II et de vitellogenèse avancée appartenant au stade VI. Cette observation suggère que la perte du *miR-202* entraîne une levée d'inhibition de la croissance. Le départ incontrôlé de follicules vers la croissance semble ainsi être en faveur d'un épuisement progressif mais prématuré de la réserve immature de follicules. Ce rôle

du miR-202, exprimé dans les cellules somatiques folliculaires chez le médaka, serait cohérent comme il a auparavant été mis en évidence que les cellules somatiques seraient impliquées dans la régulation de l'activation des follicules primordiaux chez les mammifères (H. Zhang et Liu 2015; Skinner 2005). Il pourrait aussi expliquer une perte de qualité des œufs, observée par Gay et *al* (Gay et al. 2018), par la dérégulation de la coordination des mécanismes de communication hormonale (Kim et al. 2021). Toutefois, la baisse de fécondité des femelles de cette lignée semble liée à deux effets parallèles sur le rythme de recrutement. Alors que la transition des follicules primordiaux vers la croissance primaire paraît accélérée, le deuxième recrutement vers la croissance secondaire apparaît inhibé en l'absence de miR-202 chez l'adulte mature. Chez les individus sauvages, nous avons vu que ces mécanismes ont lieu majoritairement à deux temps différents, privilégiant le recrutement à partir de la réserve immature surtout au cours de la phase de croissance, alors que le recrutement en croissance secondaire semble plus intense que le recrutement immature au cours de la phase de reproduction. Chez ces mutants, les observations suggèrent une inversion de cette tendance, et donc un rôle du miR-202 dans la régulation de ces deux recrutements. De plus, l'expression du miR-202 semble différentielle à la transition entre croissance primaire et secondaire chez plusieurs espèces de téléostéens (Wong et al. 2018; Juanchich 2013), ce qui soutient nos hypothèses d'un rôle particulier dans au moins l'un de ces deux recrutements. Ainsi, l'identification de ces deux mécanismes dérégulés peuvent dorénavant servir à guider d'autres analyses moléculaires dans l'objectif de confirmer les gènes ciblés par le miR-202, notamment ceux qui seraient phénotypiquement pertinents.

D'après la littérature, de nombreux mécanismes de signalisation semblent impliqués dans la régulation de la quiescence ovocytaire ou de la transition vers la croissance secondaire. Dans une étude transcriptomique récente sur le poisson-zèbre, les auteurs ont identifié de nombreux gènes à expression différentielle au cours de la transition croissance primaire/secondaire. Parmi eux, on retrouve l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse ou dans différentes voies de signalisation comme TGF β , phosphatidylinositol (Pi3K/PTEN/Akt) ou BMP (Zhu et al. 2018). De manière intéressante, la voie TGF β semble être inhibée chez les mutants miR-202, ainsi que l'expression de certaines enzymes de la stéroïdogénèse (*cyp19*, *cyp17*) (Gay et al. 2018). Ces données sont ainsi cohérentes avec l'inhibition de la transition vers la croissance secondaire observée par nos analyses. La mise en place des rétrocontrôles via la signalisation FSH semble également particulièrement importante dans la poursuite de la croissance vers la vitellogénèse, comme l'ont montré de récentes études chez le poisson-zèbre ou le médaka (Z. Zhang et al. 2015; Murozumi et al. 2014; J. Li et Ge 2020). D'autres facteurs comme des facteurs de croissance (IGF, EGF) ou des androgènes (11-KT, T) semblent également jouer un rôle significatif dans la stimulation de la croissance primaire et de la transition vers la croissance secondaire (Lokman et al. 2007; Watanabe et al. 1998; Monson et al. 2017; J. Li et al. 2021; Y. Xie et al. 2021). De manière intéressante, l'étude transcriptomique de Zhu et *al* a également identifié des processus régulés à la baisse au cours de cette transition, notamment des gènes associés à la formation de l'enveloppe de l'œuf, au mécanisme de « RNA silencing » ou encore au processus de méiose (Zhu et al. 2018). Le rôle de la régulation de la croissance folliculaire par les micro-ARNs est ainsi fortement suggéré et supporte nos observations suggérant un rôle du miR-202 dans ce processus.

Dans le mécanisme de maintien de la quiescence ovocytaire, les voies de signalisation mTORC1 et PI3K/Akt semblent jouer un rôle majeur. L'activation excessive de la voie mTOR semble notamment liée à une activation prématurée des ovocytes quiescents chez la souris (Kim *et al* 2021, H. Zhang et Liu 2015; H. Zhang et al. 2014). La délétion de *PTEN*, acteur de la voie PI3K/Akt est suggérée dans l'activation prématurée du pool folliculaire primordial chez la souris (Reddy et al. 2008). Récemment, un rôle des androgènes a été mis en évidence, avec une action sur la signalisation FSH, dans l'activation du développement initial en pré-vitellogenèse chez l'anguille (S.-C. Lee et Lou 2019). Des signaux noradrénergiques ont été également suggérés comme régulateurs importants de l'activation de la croissance des follicules primordiaux chez le poisson-zèbre (Kim 2021, 2022).

Dans plusieurs études, des appartenant aux voies de signalisation citées ci-dessus ont été proposées comme cibles directes du *miR-202* par prédictions *in silico* ou expériences *in vitro*. Certaines d'entre-elles constitueraient ainsi, à la vue du phénotype précis mis en évidence par nos travaux, des candidats intéressants à tester par une approche *in vivo* par édition de leur séquence cible au sein du 3'UTR. Afin d'avoir des données plus complètes permettant de prédire une liste de cibles potentielles réduites, des prélèvements d'ovaires ont été effectués au cours des derniers mois de ma thèse et seront utilisés pour réaliser un séquençage RNA-seq. Pour pouvoir évaluer la variabilité d'expression des gènes chez les mutants en limitant les biais d'interprétation liés à la variabilité inter-individus, nous avons choisi de privilégier une analyse à partir d'individus uniques. Le choix de deux stades de développement où la croissance folliculaire est relativement synchronisée devrait faciliter l'interprétation des données. De plus, le premier stade choisi correspond à un stade larvaire où aucun défaut apparent n'a été détecté dans l'ovaire, alors que le second stade, juvénile, possède une perturbation significative de l'activation de la croissance folliculaire. D'autres expériences sur follicules dissociés avant et après la transition en croissance secondaire pourraient apporter davantage de pistes concernant l'action moléculaire de miR-202 au cours de cette transition. Toutefois, certaines voies de signalisation étant à l'œuvre dans les deux mécanismes de recrutements, des gènes similaires pourraient être impliqués par la régulation via miR-202. Pour conclure, nos résultats démontrent le rôle particulier du miR-202 dans la régulation des recrutements des follicules, et s'ajoutent à de rares travaux *in vivo* s'intéressant aux rôles physiologiques des microARNs chez les vertébrés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux de ma thèse ont eu différents objectifs, d'apparence distincts mais particulièrement complémentaires. En effet, un premier objectif majeur a consisté à l'étude et la compréhension de la dynamique ovarienne chez le médaka, où l'identification de différents recrutements et leurs rythmes peuvent influencer particulièrement notre compréhension de la régulation de la fécondité chez certaines espèces de poissons. Pour supporter nos analyses, l'étude d'une lignée mutante à fécondité réduite (*miR-202-KO*) a notamment permis de mettre en lumière l'importance de la mise en place d'une distribution folliculaire continue entre les différents stades de l'ovogenèse pour le maintien d'une fécondité (nombre d'œufs et fréquence de ponte) optimale. De plus, les différences majeures observables chez les mutantes des mécanismes de recrutements en croissance primaire et secondaire a permis d'appuyer le rôle central du contrôle des recrutements de follicules dans la mise en place et le maintien de la fécondité. En parallèle, l'identification précise des mécanismes dérégulés chez la lignée *miR-202-KO* a eu un double intérêt. Cette analyse permet en effet, *via* une meilleure compréhension des dérégulations à l'échelle cellulaire mais aussi temporelle, d'apporter de nouvelles pistes de compréhension du mécanisme d'action moléculaire du miR-202 dans l'ovaire. Enfin, l'apport de nouvelles données de description du développement ovarien au cours du temps, de sa dynamique d'organisation et de régulation a été particulièrement facilité par le développement de méthodes d'analyse d'image 3D. D'abord, une première innovation méthodologique, utilisant la transparence d'ovaires entiers, a permis de dépasser les contraintes physiques d'imagerie 3D en profondeur et ainsi d'ouvrir l'accès à la production de données à l'échelle de l'organe entier. Puis, l'adaptation d'une séquence d'analyse d'images intégrant des algorithmes de deep-learning a eu un impact considérable sur l'accessibilité, la qualité, la reproductibilité et la rapidité d'analyse 3D quantitative sur des images complexes d'ovaires entiers. Ces développements méthodologiques ont ainsi largement participé à la capacité d'analyser conjointement de nombreux échantillons ovariens, à différentes étapes de développement mais aussi chez deux lignées différentes.

Les perspectives qu'ouvrent ces travaux sont nombreuses et concernent à la fois l'interprétation des données produites et l'utilisation des méthodes d'analyse d'image développées. En effet, l'analyse des données de distribution a permis de formuler de nombreuses hypothèses concernant les rythmes de recrutements, la détermination de la fécondité ou la capacité de formation *de novo* des follicules, en conditions physiologiques ou anormales (*miR-202-KO*). L'utilisation de nos données pour le développement de modèles mathématiques de prédictions permettrait à la fois de confirmer ces hypothèses, mais aussi d'en tester de nouvelles par la modification de différents paramètres environnementaux, l'induction de stress ou différentes conditions physiologiques. Un projet de modélisation de la dynamique de l'ovogenèse chez le médaka a d'ailleurs été mis en place au cours de ma thèse et se base sur les données produites dans cette étude. D'autres travaux, réalisés en amont de ma thèse, pourraient également être intégrés et offrir une meilleure compréhension de la régulation moléculaire à l'œuvre pendant le cycle de reproduction du médaka. Des données transcriptomiques ont en effet été produites à différentes étapes du cycle de reproduction, et a mis en évidence des patrons d'expression différentiels sur une durée de 24 heures. D'autres données transcriptomiques, dont la production est prévue pour la fin de cette thèse, permettront d'étudier plus précisément le mécanisme d'action du miR-202 et la validation ultérieure de cibles directes. Par ailleurs, les méthodes d'analyse d'images développées au cours de ma thèse pourront être adaptées et réutilisées dans différents contextes d'études, mais aussi sur différentes espèces de téléostéens possédant une structure ovarienne similaire. Des projets ont notamment déjà eu recours au même type d'analyse au sein du laboratoire,

mais aussi en collaboration avec d'autres équipes. D'autres analyses pourraient aussi être adaptées à partir d'une même stratégie, mais utilisant par exemples d'autres types de marqueurs permettant d'identifier des cellules ou stades de l'ovogenèse spécifiques.

REFERENCES

- Alvi, Sajid M., Yara Zayed, Ramsha Malik, et Chun Peng. 2021. « The Emerging Role of MicroRNAs in Fish Ovary: A Mini Review ». *General and Comparative Endocrinology* 311 (septembre): 113850. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113850>.
- Arcand-Hoy, Lisa D., et William H. Benson. 1998. « Fish reproduction :An ecologically relevant indicator of endocrine disruption ». *Environnemental Toxicology and Chemistry* 17 (1): 49-572.
- Arias Padilla, Luisa F, Diana C Castañeda-Cortés, Ivana F Rosa, Omar D Moreno Acosta, Ricardo S Hattori, Rafael H Nóbrega, et Juan I Fernandino. 2021. « Cystic Proliferation of Germline Stem Cells Is Necessary to Reproductive Success and Normal Mating Behavior in Medaka ». *ELife* 10 (mars): e62757. <https://doi.org/10.7554/eLife.62757>.
- Armisen, Javier, Michael J. Gilchrist, Anna Wilczynska, Nancy Standart, et Eric A. Miska. 2009. « Abundant and Dynamically Expressed MiRNAs, PiRNAs, and Other Small RNAs in the Vertebrate *Xenopus Tropicalis* ». *Genome Research* 19 (10): 1766-75. <https://doi.org/10.1101/gr.093054.109>.
- Awaji, Masahiko, et Isao Hanyu. 1987. « Annual reproductive cycle of the Wild type Medaka ». *Nippon Suisan Gakkaishi* 53 (6): 959-65.
- Babin, Patrick J., Oliana Carnevali, Esther Lubzens, et Wolfgang J. Schneider. 2007. « Molecular Aspects of Oocyte Vitellogenesis in Fish ». In *The Fish Oocyte*, édité par Patrick J. Babin, Joan Cerdà, et Esther Lubzens, 39-76. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3_2.
- Bartel, David P. 2004. « MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function ». *Cell* 116: 281-97.
- . 2009. « MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions ». *Cell* 136 (2): 215-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
- . 2018. « Metazoan MicroRNAs ». *Cell* 173 (1): 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>.
- Bizuayehu, T. T., et I. Babiak. 2014. « MicroRNA in Teleost Fish ». *Genome Biology and Evolution* 6 (8): 1911-37. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu151>.
- Bizuayehu, T.T., J. Babiak, B. Norberg, J.M.O. Fernandes, S.D. Johansen, et I. Babiak. 2012. « Sex-Biased MiRNA Expression in Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*) Brain and Gonads ». *Sexual Development* 6 (5): 257-66. <https://doi.org/10.1159/000341378>.
- Blazer, V S. 2002. « Histopathological Assessment of Gonadal Tissue in Wild Fishes ». *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 85-101.
- Bouchareb, Amine, Aurélie Le Cam, Jérôme Montfort, Stéphanie Gay, Thaovi Nguyen, Julien Bobe, et Violette Thermes. 2017. « Genome-Wide Identification of Novel Ovarian-Predominant MiRNAs: New Insights from the Medaka (*Oryzias Latipes*) ». *Scientific Reports* 7 (1): 40241. <https://doi.org/10.1038/srep40241>.
- Braat, Arie Koen, Johanna E Speksnijder, et Danica Zivkovic. 1999. « Germ Line Development in Fishes ». *Int. J. Dev. Biol.* 43: 745-60.
- Brennan, Jennifer, et Blanche Capel. 2004. « One Tissue, Two Fates: Molecular Genetic Events That Underlie Testis versus Ovary Development ». *Nature Reviews Genetics* 5 (7): 509-21. <https://doi.org/10.1038/nrg1381>.

- Breving, Kimberly, et Aurora Esquela-Kerscher. 2010. « The Complexities of MicroRNA Regulation: Mirandering around the Rules ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (8): 1316-29. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.09.016>.
- Briggs, John C., et Nobuo Egami. 1959. « The Medaka (*Oryzias Latipes*). A Commentary and a Bibliography ». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 16 (3): 363-80. <https://doi.org/10.1139/f59-029>.
- Bromage, Niall, et Ruchira Cumaratunga. 1988. « Egg Production in the Rainbow Trout ». In *Recent Advances in Aquaculture*, édité par James F. Muir et Ronald J. Roberts, 63-138. Dordrecht: Springer Netherlands. http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-9743-4_2.
- Brown-Peterson, Nancy J., David M. Wyanski, Fran Saborido-Rey, Beverly J. Macewicz, et Susan K. Lowerre-Barbieri. 2011. « A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes ». *Marine and Coastal Fisheries* 3 (1): 52-70. <https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555724>.
- Bruin, Jan-Peter de, Roger G. Gosden, Caleb E. Finch, et Bruce M. Leaman. 2004. « Ovarian Aging in Two Species of Long-Lived Rockfish, *Sebastes Aleutianus* and *S. Alutus*1 ». *Biology of Reproduction* 71 (3): 1036-42. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.019919>.
- Burow, Susann. 2020. « Characterization of Gonadotropin Receptors Fshr and Lhr in Japanese Medaka, *Oryzias Latipes* ». *General and Comparative Endocrinology*, 16.
- Campbell, B., J. Dickey, B. Beckman, G. Young, A. Pierce, H. Fukada, et P. Swanson. 2006. « Previtellogenic Oocyte Growth in Salmon: Relationships among Body Growth, Plasma Insulin-Like Growth Factor-1, Estradiol-17beta, Follicle-Stimulating Hormone and Expression of Ovarian Genes for Insulin-Like Growth Factors, Steroidogenic-Acute Regulatory Protein and Receptors for Gonadotropins, Growth Hormone, and Somatolactin1 ». *Biology of Reproduction* 75 (1): 34-44. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.049494>.
- Cao, Zigang, Xiaoyu Mao, et Lingfei Luo. 2019. « Germline Stem Cells Drive Ovary Regeneration in Poisson-zèbre ». *Cell Reports* 26 (7): 1709-1717.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.061>.
- Charitonidou, K., Panteris, E., & Ganiyas, K. (2022). Oogonial proliferation and early oocyte dynamics during the reproductive cycle of two Clupeiform fish species. *Journal of Fish Biology*, 1– 9. <https://doi.org/10.1111/jfb.15236>
- Chen, Jian, Tanxi Cai, Chunwei Zheng, Xiwen Lin, Guojun Wang, Shangying Liao, Xiuxia Wang, et al. 2016. « MicroRNA-202 Maintains Spermatogonial Stem Cells by Inhibiting Cell Cycle Regulators and RNA Binding Proteins ». *Nucleic Acids Research*, décembre, gkw1287. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1287>.
- Chen, Weiting, Lin Liu, et Wei Ge. 2017. « Expression Analysis of Growth Differentiation Factor 9 (Gdf9/Gdf9), Anti-Müllerian Hormone (Amh/Amh) and Aromatase (Cyp19a1a/Cyp19a1a) during Gonadal Differentiation of the Poisson-zèbre, *Danio Rerio*† ». *Biology of Reproduction* 96 (2): 401-13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144964>.
- Chen, Weiting, Yue Zhai, Bo Zhu, Kun Wu, Yuqin Fan, Xianqing Zhou, Lin Liu, et Wei Ge. 2022. « Loss of Growth Differentiation Factor 9 Causes an Arrest of Early Folliculogenesis in Poisson-zèbre – a Novel Insight into Its Action Mechanism ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.07.01.498398>.
- Connolly, Michelle H., Rachel M. Dutkosky, Tze P. Heah, Gary S. Sayler, et Theodore B. Henry. 2014. « Temporal Dynamics of Oocyte Growth and Vitellogenin Gene Expression in Poisson-zèbre (*Danio Rerio*) ». *Poisson-zèbre* 11 (2): 107-14. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0938>.

- Corriero, Aldo, Rosa Zupa, Constantinos C. Mylonas, et Letizia Passantino. 2021. « Atresia of Ovarian Follicles in Fishes, and Implications and Uses in Aquaculture and Fisheries ». *Journal of Fish Diseases* 44 (9): 1271-91. <https://doi.org/10.1111/jfd.13469>.
- De Felici, Massimo, et Francesca Gioia Klinger. 2021. « PI3K/PTEN/AKT Signaling Pathways in Germ Cell Development and Their Involvement in Germ Cell Tumors and Ovarian Dysfunctions ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (18): 9838. <https://doi.org/10.3390/ijms22189838>.
- DeFalco, Tony, et Blanche Capel. 2009. « Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25 (1): 457-82. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.13350>.
- Deng, Xinchao, Congzhe Hou, Zhen Liang, Huali Wang, Lin Zhu, et Hui Xu. 2017. « MiR-202 Suppresses Cell Proliferation by Targeting FOXR2 in Endometrial Adenocarcinoma ». *Disease Markers* 2017: 1-8. <https://doi.org/10.1155/2017/2827435>.
- Denzler, Rémy, Vikram Agarwal, Joanna Stefano, David P. Bartel, et Markus Stoffel. 2014. « Assessing the CeRNA Hypothesis with Quantitative Measurements of MiRNA and Target Abundance ». *Molecular Cell* 54 (5): 766-76. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.045>.
- Deriche, Rachid. 1987. « Using Canny's Criteria to Derive a Recursively Implemented Optimal Edge Detector ». *International Journal of Computer Vision* 1 (2): 167-87. <https://doi.org/10.1007/BF00123164>.
- Ding, Qiang, Miaohan Jin, Yaoyue Wang, Jiao Liu, Peter Kalds, Ying Wang, Yuxin Yang, Xiaolong Wang, et Yulin Chen. 2020. « Transactivation of MiR-202-5p by Steroidogenic Factor 1 (SF1) Induces Apoptosis in Goat Granulosa Cells by Targeting TGF β R2 ». *Cells* 9 (2): 445. <https://doi.org/10.3390/cells9020445>.
- Donadeu, F X, S N Schauer, et S D Sontakke. 2012. « Involvement of MiRNAs in Ovarian Follicular and Luteal Development ». *Journal of Endocrinology* 215 (3): 323-34. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0252>.
- Dranow, Daniel B., Kevin Hu, April M. Bird, S. Terese Lawry, Melissa T. Adams, Angelica Sanchez, James F. Amatruda, et Bruce W. Draper. 2016. « Bmp15 Is an Oocyte-Produced Signal Required for Maintenance of the Adult Female Sexual Phenotype in Poisson-zèbre ». Édité par Mary C. Mullins. *PLOS Genetics* 12 (9): e1006323. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006323>.
- Egami, N. 1969. « Life Span Data for the Small Fish, *Oryzias Latipes* ». *Experimental Gerontology* 4 (2): 127-29. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(69\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0531-5565(69)90035-7).
- Elkouby, Yaniv M. 2017. « All in One – Integrating Cell Polarity, Meiosis, Mitosis and Mechanical Forces in Early Oocyte Differentiation in Vertebrates ». *The International Journal of Developmental Biology* 61 (3-4-5): 179-93. <https://doi.org/10.1387/ijdb.170030ye>.
- Elkouby, Yaniv M., et Mary C. Mullins. 2017. « Methods for the Analysis of Early Oogenesis in Poisson-zèbre ». *Developmental Biology* 430 (2): 310-24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.014>.
- Emerson, L. S., M. Greer Walker, et P. R. Witthames. 1990. « A Stereological Method for Estimating Fish Fecundity ». *Journal of Fish Biology* 36 (5): 721-30. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb04326.x>.
- Eschweiler, Dennis, Richard S. Smith, et Johannes Stegmaier. 2022. « Robust 3D Cell Segmentation: Extending the View of Cellpose ». arXiv. <http://arxiv.org/abs/2105.00794>.
- Fiorentino, Giulia, Annapaola Parrilli, Silvia Garagna, et Maurizio Zuccotti. 2021. « Three-Dimensional Imaging and Reconstruction of the Whole Ovary and Testis: A New

- Frontier for the Reproductive Scientist ». *Molecular Human Reproduction* 27 (3): gaab007. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab007>.
- Franco-Zorrilla, José Manuel, Adrián Valli, Marco Todesco, Isabel Mateos, María Isabel Puga, Ignacio Rubio-Somoza, Antonio Leyva, Detlef Weigel, Juan Antonio García, et Javier Paz-Ares. 2007. « Target Mimicry Provides a New Mechanism for Regulation of MicroRNA Activity ». *Nature Genetics* 39 (8): 1033-37. <https://doi.org/10.1038/ng2079>.
- Frétaud, Maxence, Laurie Rivière, Élodie De Job, Stéphanie Gay, Jean-Jacques Lareyre, Jean-Stéphane Joly, Pierre Affaticati, et Violette Thermes. 2017. « High-Resolution 3D Imaging of Whole Organ after Clearing: Taking a New Look at the Poisson-zèbre Testis ». *Scientific Reports* 7 (1): 43012. <https://doi.org/10.1038/srep43012>.
- Gamo, H TI. 1961. « On the origin of germ cells and formation of gonad primordia in the medaka, *Oryzias latipes* ». *Japanese journal of zoology* 13 (101-105).
- Ganias, K., C. Nunes, et Y. Stratoudakis. 2008. « Use of Late Ovarian Atresia in Describing Spawning History of Sardine, *Sardina Pilchardus* ». *Journal of Sea Research* 60 (4): 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2008.06.004>.
- Ganias, Konstantinos. 2013. « Determining the Indeterminate: Evolving Concepts and Methods on the Assessment of the Fecundity Pattern of Fishes ». *Fisheries Research* 138 (février): 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.05.006>.
- Ganias, Konstantinos, Foivos-Alexandros Mouchlianitis, Cristina Nunes, Ana-Maria Costa, et Maria-Manuel Angélico. 2017. « A Reassessment of the Fecundity Type of Atlantic Horse Mackerel (*Trachurus Trachurus*) in Atlantic Iberian Waters (ICES Division IXa) Shows That Indeterminate Spawners Can Cease Recruiting Oocytes during Their Spawning Season ». Édité par Emory Anderson. *ICES Journal of Marine Science* 74 (1): 31-40. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw146>.
- Ganias, Konstantinos, Stylianos Somarakis, Athanassios Machias, et Athanasios Theodorou. 2004. « Pattern of Oocyte Development and Batch Fecundity in the Mediterranean Sardine ». *Fisheries Research* 67 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2003.08.008>.
- Ganias, Kostas, et Susan Lowerre-Barbieri. 2018. « Oocyte Recruitment and Fecundity Type in Fishes: Refining Terms to Reflect Underlying Processes and Drivers ». *Fish and Fisheries* 19 (3): 562-72. <https://doi.org/10.1111/faf.12267>.
- Gautier, Aude, Florence Le Gac, et Jean-Jacques Lareyre. 2011. « The Gsdf Gene Locus Harbors Evolutionary Conserved and Clustered Genes Preferentially Expressed in Fish Previtellogenic Oocytes ». *Gene* 472 (1-2): 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.10.014>.
- Gay, Stéphanie, Jérôme Bugeon, Amine Bouchareb, Laure Henry, Clara Delahaye, Fabrice Legeai, Jérôme Montfort, et al. 2018. « MiR-202 Controls Female Fecundity by Regulating Medaka Oogenesis ». Édité par Manfred Schartl. *PLOS Genetics* 14 (9): e1007593. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007593>.
- Gómez-de-Mariscal, E., García-López-de-Haro, C., Ouyang, W. et al. DeepImageJ: A user-friendly environment to run deep learning models in ImageJ. *Nat Methods* 18, 1192–1195 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01262-9>
- Goncharova, Anna S., Alf Honigsmann, Florian Jug, et Alexander Krull. 2020. « Improving Blind Spot Denoising for Microscopy ». arXiv. <http://arxiv.org/abs/2008.08414>.
- Greer Walker, M., P. R. Witthames, et I. Bautista de los Santos. 1994. « Is the Fecundity of the Atlantic Mackerel (*Scomber Scombrus*: Scombridae) Determinate? » *Sarsia* 79 (1): 13-26. <https://doi.org/10.1080/00364827.1994.10413543>.
- Grier, Harry J. 2002. « The germinal epithelium: Its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. »

- https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/29467/gcfi_53-47.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Grier, Harry J., Mari Carmen Uribe, Fabiana L. Lo Nostro, Steven D. Mims, et Lynne R. Parenti. 2016. « Conserved Form and Function of the Germinal Epithelium through 500 Million Years of Vertebrate Evolution: Vertebrate Germinal Epithelium ». *Journal of Morphology* 277 (8): 1014-44. <https://doi.org/10.1002/jmor.20554>.
- Guan, Guijun, Kaiqing Sun, Xi Zhang, Xiaomiao Zhao, Mingyou Li, Yan Yan, Yunzhi Wang, Jianbin Chen, Meisheng Yi, et Yunhan Hong. 2017. « Developmental Tracing of Oocyte Development in Gonadal Soma-Derived Factor Deficiency Medaka (*Oryzias Latipes*) Using a Transgenic Approach ». *Mechanisms of Development* 143 (février): 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.12.006>.
- Guiguen, Yann, Alexis Fostier, Francesc Piferrer, et Ching-Fong Chang. 2010. « Ovarian Aromatase and Estrogens: A Pivotal Role for Gonadal Sex Differentiation and Sex Change in Fish ». *General and Comparative Endocrinology* 165 (3): 352-66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2009.03.002>.
- Guraya, Sardul S. 1979. « Recent Advances in the Morphology, Cytochemistry, and Function of Balbiani's Vitelline Body in Animal Oocytes ». In *International Review of Cytology*, 59:249-321. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61664-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61664-2).
- Hamaguchi, Satoshi. 1982. « A Light- and Electron-Microscopic Study on the Migration of Primordial Germ Cells in the Teleost, *Oryzias Latipes* ». *Cell and Tissue Research* 227 (1). <https://doi.org/10.1007/BF00206337>.
- Heins, David C., et Nancy J. Brown-Peterson. 2022. « The Reproductive Biology of Small Fishes and the Clutch Concept: Combining Macroscopic and Histological Approaches ». *Aquaculture, Fish and Fisheries* 2 (4): 253-64. <https://doi.org/10.1002/aff2.49>.
- Herpin, Amaury, Mateus C. Adolphi, Barbara Nicol, Maria Hinzmann, Cornelia Schmidt, Johanna Klughammer, Mareen Engel, Minoru Tanaka, Yann Guiguen, et Manfred Schartl. 2013. « Divergent Expression Regulation of Gonad Development Genes in Medaka Shows Incomplete Conservation of the Downstream Regulatory Network of Vertebrate Sex Determination ». *Molecular Biology and Evolution* 30 (10): 2328-46. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst130>.
- Herpin, Amaury, Peter Fischer, Daniel Liedtke, Nils Kluever, Cordula Neuner, Erez Raz, et Manfred Schartl. 2008. « Sequential SDF1a and B-Induced Mobility Guides Medaka PGC Migration ». *Developmental Biology* 320 (2): 319-27. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.030>.
- Hossain, M. M., M. M. H. Sohel, K. Schellander, et D. Tesfaye. 2012. « Characterization and Importance of MicroRNAs in Mammalian Gonadal Functions ». *Cell and Tissue Research* 349 (3): 679-90. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1469-6>.
- Hossain, M.M., D. Salilew-Wondim, K. Schellander, et D. Tesfaye. 2012. « The Role of MicroRNAs in Mammalian Oocytes and Embryos ». *Animal Reproduction Science* 134 (1-2): 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.009>.
- Hsu, Chen-wei, et Bon-chu Chung. 2021. « Evolution, Expression, and Function of Gonadal Somatic Cell-Derived Factor ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (juillet): 684352. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.684352>.
- Hu, Ruiqin, Yanna Xu, Bingshe Han, Yi Chen, Wenhao Li, Guijun Guan, Peng Hu, Yan Zhou, Qianghua Xu, et Liangbiao Chen. 2022. « MiR-202-3p Determines Embryo Viability during Mid-Blastula Transition ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (août): 897826. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.897826>.
- Hunter, J Roe, et Nancy C H Lo. 1985. « Batch Fecundity in Multiple Spawning Fishes », 11.

- Hunter, J Roe, et Beverly J Macewicz. 1985. « Measurement of Spawning Frequency in Multiple Spawning Fishes ». *NOAA Technical*, 19.
- Hunter, Roe. 1992. « Fecundity, Spawning, and Maturity of Female Dover Sale *Microstomus Pacificus*, with an Evaluation of Assumptions and Precision ». *Fishery Bulletin* 90 (1): 28.
- Hussein, Mahmoud R. 2005. « Apoptosis in the Ovary: Molecular Mechanisms ». *Human Reproduction Update* 11 (2): 162-78. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi001>.
- HY, Yu, et Pan SS. 2020. « MiR-202-5p Suppressed Cell Proliferation, Migration and Invasion in Ovarian Cancer via Regulating HOXB2 ». *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24 (5): 2256-63. https://doi.org/10.26355/eurrev_202003_20491.
- Imai, Takuto, Kentaro Saino, et Masaru Matsuda. 2015. « Mutation of Gonadal Soma-Derived Factor Induces Medaka XY Gonads to Undergo Ovarian Development ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (1): 109-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.112>.
- Imbar, Tal, et Iris Eisenberg. 2014. « Regulatory Role of MicroRNAs in Ovarian Function ». *Fertility and Sterility* 101 (6): 1524-30. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.024>.
- İnik, Özkan, Ayşe Ceyhan, Esra Balcıoğlu, et Erkan Ülker. 2019. « A New Method for Automatic Counting of Ovarian Follicles on Whole Slide Histological Images Based on Convolutional Neural Network ». *Computers in Biology and Medicine* 112 (septembre): 103350. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2019.103350>.
- Iwamatsu, T. 1978. « Studies on Oocyte Maturation of the Medaka, *Oryzias Latipes*. VI. Relationship between the Circadian Cycle of Oocyte Maturation and Activity of the Pituitary Gland ». *Journal of Experimental Zoology* 206 (3): 355-63. <https://doi.org/10.1002/jez.1402060307>.
- Iwamatsu, T., S. Y. Takahashi, N. Sakai, Y. Nagahama, et K. Onitake. 1987. « Induction and Inhibition of in Vitro Oocyte Maturation and Production of Steroids in Fish Follicles by Forskolin ». *Journal of Experimental Zoology* 241 (1): 101-11. <https://doi.org/10.1002/jez.1402410113>.
- Iwamatsu, Takashi. 1988. « Oogenesis in the Medaka *Oryzias Latipes*: Stages of Oocyte Development ». *Zoological Science* 5: 353-73.
- . 2004. "Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*". *Mechanisms of Development*, 121: 605-618. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.012>.
- . 2015. « Growth of the Medaka (IV) - Dynamics of Oocytes in the Ovary During Metamorphosis ». *Bulletin of Aichi Univ. of Education (Natural Sciences)*. Pp.37-46.
- J. GERALD QUIRK, et JAMES B. HAMILTON. 1973. « Number of Germ Cells in Known Male and Known Female Genotypes of Vertebrate Embryos (*Oryzias Latipes*) ». *SCIENCE* VOL. 180: 963-64.
- Jalabert, Bernard. 2005. « Particularities of Reproduction and Oogenesis in Teleost Fish Compared to Mammals ». *Reproduction Nutrition Development* 45 (3): 261-79. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005019>.
- Jamieson-Lucy, Allison, et Mary C. Mullins. 2019. « The Vertebrate Balbiani Body, Germ Plasm, and Oocyte Polarity ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 135:1-34. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.04.003>.
- Jeongho Kim, Young-Jai You, Oocyte Quiescence: From Formation to Awakening, *Endocrinology*, Volume 163, Issue 6, June 2022, bqac049, <https://doi.org/10.1210/endo/bqac049>
- Jin, Hyun Yong, Alicia Gonzalez-Martin, Ana V. Miletic, Maoyi Lai, Sarah Knight, Mohsen Sabouri-Ghomi, Steven R. Head, Matthew S. Macauley, Robert C. Rickert, et Changchun Xiao. 2015. « Transfection of MicroRNA Mimics Should Be Used with

- Jin, Yilin, Wei Liu, Yangxi Xiang, Wanwan Zhang, Hong Zhang, Kuntong Jia, et Meisheng Yi. 2020. « Maternal MiR-202-5p Is Required for Poisson-zèbre Primordial Germ Cell Migration by Protecting Small GTPase Cdc42 ». Édité par Anming Meng. *Journal of Molecular Cell Biology* 12 (7): 530-42. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz103>.
- Johnson, Dr Rodney, Dr Jeffrey Wolf, et Dr Thomas Braunbeck. 2009. « OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads », 42.
- Juanchich, Amelie. 2013. « Identification of Differentially Expressed MiRNAs and Their Potential Targets During Fish Ovarian Development ». *Biology of Reproduction* 88 (5): 12.
- Kagawa, Hirohiko. 2013. « Oogenesis in Teleost Fish ». *Aqua-BioScience Monographs* 6 (4): 99-127. <https://doi.org/10.5047/absm.2013.00604.0099>.
- Kar, Anuradha, Manuel Petit, Yassin Refahi, Guillaume Cerutti, Christophe Godin, et Jan Traas. 2021. « Assessment of Deep Learning Algorithms for 3D Instance Segmentation of Confocal Image Datasets ». *BioRxiv*, 45.
- Kasahara, Masahiro, Kiyoshi Naruse, Shin Sasaki, Yoichiro Nakatani, Wei Qu, Budrul Ahsan, Tomoyuki Yamada, et al. 2007. « The Medaka Draft Genome and Insights into Vertebrate Genome Evolution ». *Nature* 447 (7145): 714-19. <https://doi.org/10.1038/nature05846>.
- Kass, Michael, Andrew Witkin, et Demetri Terzopoulos. 1988. « Snakes: Active Contour Models ». *International Journal of Computer Vision* 1 (4): 321-31. <https://doi.org/10.1007/BF00133570>.
- Kayo, Daichi, Buntaro Zempo, Soma Tomihara, Yoshitaka Oka, et Shinji Kanda. 2019. « Gene Knockout Analysis Reveals Essentiality of Estrogen Receptor B1 (Esr2a) for Female Reproduction in Medaka ». *Scientific Reports* 9 (1): 8868. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45373-y>.
- Kestemont, Patrick, et Jean-Claude Philippart. 1991. « CONSIDÉRATIONS SUR LA CROISSANCE OVOCYTAIRE CHEZ LES POISSONS À OVOGENÈSE SYNCHRONE ET ASYNCHRONE ». *Belg. J. Zool.* 121 (1): 87-98.
- Kezele, Phillip, et Michael K. Skinner. 2003. « Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly ». *Endocrinology* 144 (8): 3329-37. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0131>.
- Khoo, Khay Huat. 1979. « The Histochemistry and Endocrine Control of Vitellogenesis in Goldfish Ovaries ». *Canadian Journal of Zoology* 57 (3): 617-26. <https://doi.org/10.1139/z79-073>.
- Kim, J., Hyun, M., Hibi, M. et al. Maintenance of quiescent oocytes by noradrenergic signals. *Nat Commun* 12, 6925 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26945-x>
- Kjesbu, O. S., et J. C. Holm. 1994. « Oocyte Recruitment in First-Time Spawning Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) in Relation to Feeding Regime ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51 (8): 1893-98. <https://doi.org/10.1139/f94-189>.
- Kjesbu, Olav S., Anders Thorsen, et Merete Fonn. 2011. « Quantification of Primary and Secondary Oocyte Production in Atlantic Cod by Simple Oocyte Packing Density Theory ». *Marine and Coastal Fisheries* 3 (1): 92-105. <https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555714>.
- Knight, Phil G, et Claire Glister. 2006. « TGF- β Superfamily Members and Ovarian Follicle Development ». *Reproduction* 132 (2): 191-206. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>.

- Kobayashi, Daisuke, Minoru Tanaka, Sachiko Fukada, et Yoshitaka Nagahama. 1996. « Steroidogenesis in the Ovarian Follicles of the Medaka (*Oryzias Latipes*) during Vitellogenesis and Oocyte Maturation ». *Zoological Science* 13 (6): 921-27. <https://doi.org/10.2108/zsj.13.921>.
- Kobayashi, Tohru, Masaru Matsuda, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Aya Suzuki, Noriko Saito, Masatoshi Nakamoto, Naoki Shibata, et Yoshitaka Nagahama. 2004. « Two DM Domain Genes, DMY And DMRT1, Involved in Testicular Differentiation and Development in the Medaka, *Oryzias Latipes* ». *Developmental Dynamics* 231 (3): 518-26. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20158>.
- Koger, C.S., S.J. Teh, et D.E. Hinton. 1999. « Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*)1 ». *Biology of Reproduction* 61 (5): 1287-93. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.5.1287>.
- Kondo, M., I. Nanda, M. Schmid, et M. Schartl. 2009. « Sex Determination and Sex Chromosome Evolution: Insights from Medaka ». *Sexual Development* 3 (2-3): 88-98. <https://doi.org/10.1159/000223074>.
- Korta, Maria, Hilario Murua, Yutaka Kurita, et Olav S. Kjesbu. 2010. « How Are the Oocytes Recruited in an Indeterminate Fish? Applications of Stereological Techniques along with Advanced Packing Density Theory on European Hake (*Merluccius Merluccius L.*) ». *Fisheries Research* 104 (1-3): 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.01.010>.
- Kortner, Trond M., Eduardo Rocha, et Augustine Arukwe. 2009. « Androgenic Modulation of Early Growth of Atlantic Cod (*Gadus Morhua L.*) Previtellogenic Oocytes and Zona Radiata-Related Genes ». *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72 (3-4): 184-95. <https://doi.org/10.1080/15287390802539020>.
- Krull, Alexander, Tim-Oliver Buchholz, et Florian Jug. 2019. « Noise2Void - Learning Denoising from Single Noisy Images ». *ArXiv:1811.10980 [Cs]*, avril. <http://arxiv.org/abs/1811.10980>.
- Kuang, Haixue, Dongwei Han, Jiaming Xie, Yongxin Yan, Ji Li, et Pengling Ge. 2014. « Profiling of Differentially Expressed MicroRNAs in Premature Ovarian Failure in an Animal Model ». *Gynecological Endocrinology* 30 (1): 57-61. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.850659>.
- Kumar, M Jogendra, Dr GVS Raj Kumar, et R Vijay Kumar Reddy. 2014. « REVIEW ON IMAGE SEGMENTATION TECHNIQUES » 3 (6): 7.
- Kurita, Yutaka, et Olav S. Kjesbu. 2009. « Fecundity Estimation by Oocyte Packing Density Formulae in Determinate and Indeterminate Spawners: Theoretical Considerations and Applications ». *Journal of Sea Research* 61 (3): 188-96. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2008.10.010>.
- Kurokawa, H., D. Saito, S. Nakamura, Y. Katoh-Fukui, K. Ohta, T. Baba, K.-i. Morohashi, et M. Tanaka. 2007. « Germ Cells Are Essential for Sexual Dimorphism in the Medaka Gonad ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (43): 16958-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609932104>.
- Kurokawa, Hiromi, Yumiko Aoki, Shuhei Nakamura, Youko Ebe, Daisuke Kobayashi, et Minoru Tanaka. 2006. « Time-Lapse Analysis Reveals Different Modes of Primordial Germ Cell Migration in the Medaka *Oryzias Latipes* ». *Development, Growth and Differentiation* 48 (3): 209-21. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00858.x>.
- Lai, Eric C. 2015. « Two Decades of miRNA Biology: Lessons and Challenges ». *RNA* 21 (4): 675-77. <https://doi.org/10.1261/rna.051193.115>.
- Lalit, Manan, Pavel Tomancak, et Florian Jug. 2021. « Embedding-Based Instance Segmentation in Microscopy ». *ArXiv:2101.10033 [Cs, Eess]*, avril. <http://arxiv.org/abs/2101.10033>.

- Landgraf, Pablo, Mirabela Rusu, Robert Sheridan, Alain Sewer, Nicola Iovino, Alexei Aravin, Sébastien Pfeffer, et al. 2007. « A Mammalian MicroRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing ». *Cell* 129 (7): 1401-14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>.
- Lawrence, Christian, Isaac Adatto, Jason Best, Althea James, et Kara Maloney. 2012. « Generation Time of Poisson-zèbre (*Danio Rerio*) and Medakas (*Oryzias Latipes*) Housed in the Same Aquaculture Facility ». *Lab Animal* 41 (6): 158-65. <https://doi.org/10.1038/labon0612-158>.
- Lee, Rosalind C., Rhonda L. Feinbaum, et Victor Ambros. 1993. « The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14* ». *Cell* 75: 843-54.
- Lee, Shang-Chien, et Show-Wan Lou. 2019. « Androgenic Modulation in the Primary Ovarian Growth of the Japanese Eel, *Anguilla Japonica* ». *Zoological Studies*, 15.
- Li, Jianzhen, et Wei Ge. 2020. « Poisson-zèbre as a Model for Studying Ovarian Development: Recent Advances from Targeted Gene Knockout Studies ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 507 (mai): 110778. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110778>.
- Li, Jianzhen, Zhiquan Liu, Tao Kang, Minghui Li, Deshou Wang, et Christopher H K Cheng. 2021. « *Igf3*: A Novel Player in Fish Reproduction ». *Biology of Reproduction* 104 (6): 1194-1204. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab042>.
- Li, Minghui, Lina Sun, et Deshou Wang. 2019. « Roles of Estrogens in Fish Sexual Plasticity and Sex Differentiation ». *General and Comparative Endocrinology* 277 (juin): 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.11.015>.
- Li, Ying, Ying Fang, Ying Liu, et Xiaokui Yang. 2015. « MicroRNAs in Ovarian Function and Disorders ». *Journal of Ovarian Research* 8 (1): 51. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0162-2>.
- Liao, Pei-Han, Szu-Hung Chu, Tzu-Yi Tu, Xiao-Huan Wang, Angela Yu-Chen Lin, et Pei-Jen Chen. 2014. « Persistent Endocrine Disruption Effects in Medaka Fish with Early Life-Stage Exposure to a Triazole-Containing Aromatase Inhibitor (Letrozole) ». *Journal of Hazardous Materials* 277 (juillet): 141-49. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.02.013>.
- Liu, Lin, et Wei Ge. 2007. « Growth Differentiation Factor 9 and Its Spatiotemporal Expression and Regulation in the Poisson-zèbre Ovary1 ». *Biology of Reproduction* 76 (2): 294-302. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054668>.
- Liu, Tao, Jichao Guo, et Xiaoxia Zhang. 2019. « MiR-202-5p/ *PTEN* Mediates Doxorubicin-Resistance of Breast Cancer Cells via PI3K/Akt Signaling Pathway ». *Cancer Biology & Therapy* 20 (7): 989-98. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1591674>.
- Lokman, P Mark, Kataraina A N George, Sean L Divers, Michael Algie, et Graham Young. 2007. « 11-Ketotestosterone and IGF-I Increase the Size of Previtellogenic Oocytes from Shortfinned Eel, *Anguilla Australis*, in Vitro ». *Reproduction* 133 (5): 955-67. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0229>.
- Lowerre-Barbieri, Susan K., Nancy J. Brown-Peterson, Hilario Murua, Jonna Tomkiewicz, David M. Wyanski, et Fran Saborido-Rey. 2011. « Emerging Issues and Methodological Advances in Fisheries Reproductive Biology ». *Marine and Coastal Fisheries* 3 (1): 32-51. <https://doi.org/10.1080/19425120.2011.555725>.
- Lu, Huijie, Yong Cui, Liwen Jiang, et Wei Ge. 2017. « Functional Analysis of Nuclear Estrogen Receptors in Poisson-zèbre Reproduction by Genome Editing Approach ». *Endocrinology* 158 (7): 2292-2308. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00215>.
- Lubzens, Esther, Graham Young, Julien Bobe, et Joan Cerdà. 2010. « Oogenesis in Teleosts: How Fish Eggs Are Formed ». *General and Comparative Endocrinology* 165 (3): 367-89. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>.

- Matsuda, Masaru, Yoshitaka Nagahama, Ai Shinomiya, Tadashi Sato, Chika Matsuda, Tohru Kobayashi, Craig E. Morrey, et al. 2002. « DMY Is a Y-Specific DM-Domain Gene Required for Male Development in the Medaka Fish ». *Nature* 417 (6888): 559-63. <https://doi.org/10.1038/nature751>.
- McCulloch, Warren S., et Walter Pitts. 1943. « A Logical Calculus of the Ideas Immanent in Nervous Activity ». *Bull. Math. Biophys.* 5 (4): 115-33.
- Medina, Antonio, Magro Ana, José Antonio Paullada-Salmeron, et José Luis Varela. 2021. « An autofluorescence-based survey of late follicular atresia in ovaries of a teleost fish (*Thunnus thynnus*) ». *Journal of Fish Biology* 99: 765-72.
- Mockly, Sophie, et Hervé Seitz. 2019. « Inconsistencies and Limitations of Current MicroRNA Target Identification Methods ». In *MicroRNA Target Identification*, édité par Alessandro Laganà, 1970:291-314. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9207-2_16.
- Mody, Hardik R., Sau Wai Hung, Rakesh K. Pathak, Jazmine Griffin, Zobeida Cruz-Monserrate, et Rajgopal Govindarajan. 2017. « MiR-202 Diminishes TGF β Receptors and Attenuates TGF β 1-Induced EMT in Pancreatic Cancer ». *Molecular Cancer Research* 15 (8): 1029-39. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0327>.
- Moen, Erick, Dylan Bannon, Takamasa Kudo, William Graf, Markus Covert, et David Van Valen. 2019. « Deep Learning for Cellular Image Analysis ». *Nature Methods* 16 (12): 1233-46. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0403-1>.
- Molyneaux, Kathleen, et Christopher Wylie. 2004. « Primordial Germ Cell Migration ». *Int. J. Dev. Biol.* 48: 537-44.
- Monson, Christopher, Kristy Forsgren, Giles Goetz, Louisa Harding, Penny Swanson, et Graham Young. 2017. « A Teleost Androgen Promotes Development of Primary Ovarian Follicles in Coho Salmon and Rapidly Alters the Ovarian Transcriptome† ». *Biology of Reproduction* 97 (5): 731-45. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox124>.
- Morbey, Yolanda E, Chad Brassil, et Andrew P Hendry. 2005. « Rapid Senescence in Pacific Salmon ». *The American Naturalist* 166 (5): 14.
- Morinaga, Chikako, Daisuke Saito, Shuhei Nakamura, Takashi Sasaki, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, Hiroshi Mitani, Makoto Furutani-Seiki, Minoru Tanaka, et Hisato Kondoh. 2007. « The *Hotei* Mutation of Medaka in the Anti-Müllerian Hormone Receptor Causes the Dysregulation of Germ Cell and Sexual Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (23): 9691-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611379104>.
- Morinaga, Chikako, Takeshi Tomonaga, Takao Sasado, Hiroshi Suwa, Katsutoshi Niwa, Akihito Yasuoka, Thorsten Henrich, et al. 2004. « Mutations Affecting Gonadal Development in Medaka, *Oryzias Latipes* ». *Mechanisms of Development* 121 (7-8): 829-39. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.025>.
- Mouchlianitis, Foivos Alexandros, George Minos, et Kostas Ganiyas. 2020. « Timing of Oocyte Recruitment within the Ovulatory Cycle of Macedonian Shad, *Alosa Macedonica*, a Batch Spawning Fish with Indeterminate Fecundity ». *Theriogenology* 146 (avril): 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.050>.
- Murozumi, Norikazu, Ryo Nakashima, Toshiaki Hirai, Yasuhiro Kamei, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Takeshi Todo, et Takeshi Kitano. 2014. « Loss of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Function Causes Masculinization and Suppression of Ovarian Development in Genetically Female Medaka ». *Endocrinology* 155 (8): 3136-45. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2060>.
- Murua, H, et F Saborido-Rey. 2003. « Female Reproductive Strategies of Marine Fish Species of the North Atlantic ». *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 33 (décembre): 23-31. <https://doi.org/10.2960/J.v33.a2>.

- Nagahama, Yoshitaka. 1994. « Endocrine Regulation of Gametogenesis in Fish ». *The International Journal of Developmental Biology* 38: 217-29.
- Nagahama, Yoshitaka, et Masakane Yamashita. 2008. « Regulation of Oocyte Maturation in Fish: Regulation of Oocyte Maturation in Fish ». *Development, Growth & Differentiation* 50 (mai): S195-219. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>.
- Nakamoto, Masatoshi, Masaru Matsuda, De-Shou Wang, Yoshitaka Nagahama, et Naoki Shibata. 2006. « Molecular Cloning and Analysis of Gonadal Expression of Foxl2 in the Medaka, *Oryzias Latipes* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344 (1): 353-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.137>.
- Nakamoto, Masatoshi, Yasushi Shibata, Kaoru Ohno, Takeshi Usami, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi, Takeshi Todo, et al. 2018. « Ovarian Aromatase Loss-of-Function Mutant Medaka Undergo Ovary Degeneration and Partial Female-to-Male Sex Reversal after Puberty ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 460 (janvier): 104-22. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.013>.
- Nakamura, Masaru, Tohru Kobayashi, Xiao-Tian Chang, et Yoshitaka Nagahama. 1998. « Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish ». *The Journal of Experimental Zoology* 281 (5): 362-72. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<362::AID-JEZ3>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<362::AID-JEZ3>3.0.CO;2-M).
- Nakamura, S., K. Kobayashi, T. Nishimura, S.-i. Higashijima, et M. Tanaka. 2010. « Identification of Germline Stem Cells in the Ovary of the Teleost Medaka ». *Science* 328 (5985): 1561-63. <https://doi.org/10.1126/science.1185473>.
- Nakamura, S., I. Watakabe, T. Nishimura, J.-Y. Picard, A. Toyoda, Y. Taniguchi, N. di Clemente, et M. Tanaka. 2012. « Hyperproliferation of Mitotically Active Germ Cells Due to Defective Anti-Mullerian Hormone Signaling Mediates Sex Reversal in Medaka ». *Development* 139 (13): 2283-87. <https://doi.org/10.1242/dev.076307>.
- Nakamura, Shuhei, Yumiko Aoki, Daisuke Saito, Yoko Kuroki, Asao Fujiyama, Kiyoshi Naruse, et Minoru Tanaka. 2008. « Sox9b/Sox9a2-EGFP Transgenic Medaka Reveals the Morphological Reorganization of the Gonads and a Common Precursor of Both the Female and Male Supporting Cells ». *Molecular Reproduction and Development* 75 (3): 472-76. <https://doi.org/10.1002/mrd.20764>.
- Nakamura, Shuhei, Daisuke Kobayashi, Yumiko Aoki, Hayato Yokoi, Youko Ebe, Joachim Wittbrodt, et Minoru Tanaka. 2006. « Identification and Lineage Tracing of Two Populations of Somatic Gonadal Precursors in Medaka Embryos ». *Developmental Biology* 295 (2): 678-88. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.052>.
- Nakamura, Shuhei, Kayo Kobayashi, Toshiya Nishimura, et Minoru Tanaka. 2011. « Ovarian Germline Stem Cells in the Teleost Fish, Medaka (*Oryzias Latipes*) ». *International Journal of Biological Sciences* 7 (4): 403-9. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.403>.
- Nakamura, Shuhei, Hiromi Kurokawa, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, et Minoru Tanaka. 2009. « Two Distinct Types of Theca Cells in the Medaka Gonad: Germ Cell-Dependent Maintenance of *Cyp19a1* -Expressing Theca Cells ». *Developmental Dynamics* 238 (10): 2652-57. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22068>.
- Nakamura, Shuhei, Ikuko Watakabe, Toshiya Nishimura, Atsushi Toyoda, Yoshihito Taniguchi, et Minoru Tanaka. 2012. « Analysis of Medaka Sox9 Orthologue Reveals a Conserved Role in Germ Cell Maintenance ». Édité par Christoph Winkler. *PLoS ONE* 7 (1): e29982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029982>.
- Nanda, Indrajit, Mariko Kondo, Ute Hornung, Shuichi Asakawa, Christoph Winkler, Atsushi Shimizu, Zhihong Shan, et al. 2002. « A Duplicated Copy of DMRT1 in the Sex-Determining Region of the Y Chromosome of the Medaka, *Oryzias Latipes* ».

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (18): 11778-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.182314699>.
- Naruse, Kiyoshi, Minoru Tanaka, et Hiroyuki Takeda, éd. 2011. *Medaka*. Tokyo: Springer Japan. <http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-92691-7>.
- Neaves, William B., et Peter Baumann. 2011. « Unisexual Reproduction among Vertebrates ». *Trends in Genetics* 27 (3): 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.12.002>.
- Nicol, Barbara, Martin A. Estermann, Humphrey H-C Yao, et Namya Mellouk. 2022. « Becoming Female: Ovarian Differentiation from an Evolutionary Perspective ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (septembre): 944776. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.944776>.
- Nie, Zi-Yuan, Min Yao, Zhan Yang, Lin Yang, Xiao-Jun Liu, Jing Yu, Ying Ma, et al. 2020. « De-Regulated STAT5A/MiR-202-5p/USP15/Caspase-6 Regulatory Axis Suppresses CML Cell Apoptosis and Contributes to Imatinib Resistance ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 39 (1): 17. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1502-7>.
- Nishimura, Toshiya, Shuhei Nakamura, et Minoru Tanaka. 2016. « A Structurally and Functionally Common Unit in Testes and Ovaries of Medaka (*Oryzias Latipes*), a Teleost Fish ». *Sexual Development* 10 (3): 159-65. <https://doi.org/10.1159/000447313>.
- Nishimura, Toshiya, Tetsuya Sato, Yasuhiro Yamamoto, Ikuko Watakabe, Yasuyuki Ohkawa, Mikita Suyama, Satoru Kobayashi, et Minoru Tanaka. 2015. « Foxl3 Is a Germ Cell–Intrinsic Factor Involved in Sperm-Egg Fate Decision in Medaka ». *Science* 349 (6245): 328-31. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2657>.
- Nishimura, Toshiya, et Minoru Tanaka. 2014. « Gonadal Development in Fish ». *Sexual Development* 8 (5): 252-61. <https://doi.org/10.1159/000364924>.
- Nyuji, Mitsuo, et Akinori Takasuka. 2017. « Spawning Cycle and Fecundity of a Multiple Spawner Round Herring *Etrumeus Teres* off Southern Japan: Oocyte Growth and Maturation Analysis ». *Journal of Sea Research* 122 (avril): 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.02.009>.
- O'Brien, Jacob, Heyam Hayder, Yara Zayed, et Chun Peng. 2018. « Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation ». *Frontiers in Endocrinology* 9 (août): 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- Ogiwara, Katsueki, Chika Fujimori, Sanath Rajapakse, et Takayuki Takahashi. 2013. « Characterization of Luteinizing Hormone and Luteinizing Hormone Receptor and Their Indispensable Role in the Ovulatory Process of the Medaka ». Édité par John A. Craft. *PLoS ONE* 8 (1): e54482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054482>.
- Patiño, Reynaldo, et Craig V Sullivan. 2002. « Ovarian Follicle Growth, Maturation, and Ovulation in Teleost Fish ». *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 57-70.
- Pavlov, Dimitri A., Natal'ya G. Emel'yanova, et Georgij G. Novikov. 2009. « Reproductive Dynamics ». In *Fish Reproductive Biology*, édité par Tore Jakobsen, Michael J. Fogarty, Bernard A. Megrey, et Erlend Moksness, 48-90. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444312133.ch2>.
- Pino, Eugenia M. del, Herbert Steinbeisser, Ansgar Hofmann, Christine Dreyer, Margarita Campos, et Michael F. Trendelenburg. 1986. « Oogenesis in the Egg-Brooding Frog *Gastrotheca Riobambae* Produces Large Oocytes with Fewer Nucleoli and Low RNA Content in Comparison to *Xenopus Laevis* ». *Differentiation* 32 (1): 24-33. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1986.tb00552.x>.
- Pinzón, Natalia, Blaise Li, Laura Martinez, Anna Sergeeva, Jessy Presumey, Florence Apparailly, et Hervé Seitz. 2017. « MicroRNA Target Prediction Programs Predict Many False Positives ». *Genome Research* 27 (2): 234-45. <https://doi.org/10.1101/gr.205146.116>.

- Pollock.B.R (2019). Oogenesis, Oocyte Atresia, Ovarian Development and Reproductive Senescence in the Dusky Flathead *Platycephalus fuscus* (Teleostei). *Archives of Veterinary and Animal Sciences* 1(1). DOI: 10.5281/zenodo.3373253
- Presslauer, Christopher, Teshome Tilahun Bizuayehu, Martina Kopp, Jorge M. O. Fernandes, et Igor Babiak. 2017. « Dynamics of MiRNA Transcriptome during Gonadal Development of Poisson-zèbre ». *Scientific Reports* 7 (1): 43850. <https://doi.org/10.1038/srep43850>.
- Qiu, Weiwei, Yefei Zhu, Yun Wu, Cancan Yuan, Kerang Chen, et Mingyou Li. 2018. « Identification and Expression Analysis of MicroRNAs in Medaka Gonads ». *Gene* 646 (mars): 210-16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.062>.
- Reading, Benjamin, Linnea Andersen, Yong-Woon Ryu, Yuji Mushiobira, Takashi Todo, et Naoshi Hiramatsu. 2018. « Oogenesis and Egg Quality in Finfish: Yolk Formation and Other Factors Influencing Female Fertility ». *Fishes* 3 (4): 45. <https://doi.org/10.3390/fishes3040045>.
- Reddy, Pradeep, Lian Liu, Deepak Adhikari, Krishna Jagarlamudi, Singareddy Rajareddy, Yan Shen, Chun Du, et al. 2008. « Oocyte-Specific Deletion of *Pten* Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool ». *Science* 319 (5863): 611-13. <https://doi.org/10.1126/science.1152257>.
- Reza, Abu Musa Md Talimur, Yun-Jung Choi, Sung Gu Han, Hyuk Song, Chankyu Park, Kwonho Hong, et Jin-Hoi Kim. 2019. « Roles of MicroRNAs in Mammalian Reproduction: From the Commitment of Germ Cells to Peri-Implantation Embryos: MiRNAs in Mammalian Reproduction ». *Biological Reviews* 94 (2): 415-38. <https://doi.org/10.1111/brv.12459>.
- Richardson, Douglas S., et Jeff W. Lichtman. 2015. « Clarifying Tissue Clearing ». *Cell* 162 (2): 246-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>.
- . 2017. « SnapShot: Tissue Clearing ». *Cell* 171 (2): 496-496.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.025>.
- Rideout, Rick M, George A Rose, et Margaret P M Burton. 2005. « Skipped Spawning in Female Iteroparous Fishes ». *Fish and Fisheries* 6 (1): 50-72. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2679.2005.00174.x>.
- Ro, Seungil, Chanjae Park, Kenton M. Sanders, John R. McCarrey, et Wei Yan. 2007. « Cloning and Expression Profiling of Testis-Expressed MicroRNAs ». *Developmental Biology* 311 (2): 592-602. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.009>.
- Roth, Lauren W., Blair McCallie, Ruben Alvero, William B. Schoolcraft, Debra Minjarez, et Mandy G. Katz-Jaffe. 2014. « Altered MicroRNA and Gene Expression in the Follicular Fluid of Women with Polycystic Ovary Syndrome ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31 (3): 355-62. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0161-4>.
- Russo, Crystal, Merritt Drewery, Carolyn T. Chang, Markita Savage, Lindsey Sanchez, Zoltan Varga, Michael L. Kent, Ronald Walter, et Yuan Lu. 2022. « Assessment of Various Standard Fish Diets on Growth and Fecundity of Platyfish (*Xiphophorus maculatus*) and Medaka (*Oryzias latipes*) ». *Poisson-zèbre* 19 (5): 181-89. <https://doi.org/10.1089/zeb.2022.0004>.
- Saffman, E. E., et P. Lasko. 1999. « Germline Development in Vertebrates and Invertebrates ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (9): 1141. <https://doi.org/10.1007/s000180050363>.
- Saito, Daisuke, Chikako Morinaga, Yumiko Aoki, Shuhei Nakamura, Hiroshi Mitani, Makoto Furutani-Seiki, Hisato Kondoh, et Minoru Tanaka. 2007. « Proliferation of Germ Cells during Gonadal Sex Differentiation in Medaka: Insights from Germ Cell-Depleted Mutant Zenzai ». *Developmental Biology* 310 (2): 280-90. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.039>.

- Sakai, NORIYOSHI, TAKASHI Iwamatsu, Yoshitaka Nagahama, et Kohei Yamauchi. 1987. « Development of the Steroidogenic Capacity of Medaka (*Oryzias Latipes*) Ovarian Follicles during Vitellogenesis and Oocyte Maturation ». *General and Comparative Endocrinology* 66: 333-42.
- Sang, Qing, Zhongyuan Yao, Huan Wang, Ruizhi Feng, Haojue Wang, Xinzhi Zhao, Qinghe Xing, et al. 2013. « Identification of MicroRNAs in Human Follicular Fluid: Characterization of MicroRNAs That Govern Steroidogenesis in Vitro and Are Associated With Polycystic Ovary Syndrome in Vivo ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (7): 3068-79. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1715>.
- Santos Schmidt, Thassya C. dos, Anders Thorsen, Aril Slotte, Leif Nøttestad, et Olav S. Kjesbu. 2021. « First Thorough Assessment of de Novo Oocyte Recruitment in a Teleost Serial Spawner, the Northeast Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) Case ». *Scientific Reports* 11 (1): 21795. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01234-1>.
- Satoh, NORIYUKI, et Nobuo Egami. 1972. « Sex Differentiation of Germ Cells in the Teleost, *Oryzias Latipes*, during Normal Embryonic Development ». *J. Embryol. Exp. Morph.* 28 (2): 385-95.
- Sayed, Alaa El-Din H., Rania F. Ismail, et Hiroshi Mitani. 2018. « Oocyte Atresia in WT (HdrR) and P53 (-/-) Medaka (*Oryzias Latipes*) Exposed to UVA ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 183 (juin): 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.016>.
- Schismenou, Eudoxia, Stylianos Somarakis, Anders Thorsen, et Olav S. Kjesbu. 2012. « Dynamics of de Novo Vitellogenesis in Fish with Indeterminate Fecundity: An Application of Oocyte Packing Density Theory to European Anchovy, *Engraulis encrasicolus* ». *Marine Biology* 159 (4): 757-68. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1852-y>.
- Seitz, Hervé. 2009. « Redefining MicroRNA Targets ». *Current Biology* 19 (10): 870-73. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.059>.
- Serrat, Alba, Fran Saborido-Rey, Cristina Garcia-Fernandez, Marta Muñoz, Josep Lloret, Anders Thorsen, et Olav Sigurd Kjesbu. 2019. « New Insights in Oocyte Dynamics Shed Light on the Complexities Associated with Fish Reproductive Strategies ». *Scientific Reports* 9 (1): 18411. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54672-3>.
- Shibata, Naoki, Masatoshi Nakamoto, Yasushi Shibata, et Yoshitaka Nagahama. 2011. « Endocrine Regulation of Oogenesis in the Medaka, *Oryzias latipes* ». In *Medaka: A Model for Organogenesis, Human Disease, and Evolution*, édité par Kiyoshi Naruse, Minoru Tanaka, et Hiroyuki Takeda, 269-85. Tokyo: Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-92691-7_18.
- Shinomiya, Ai, Satoshi Hamaguchi, et Naoki Shibata. 2001. « Sexual Differentiation of Germ Cell Deficient Gonads in the Medaka, *Oryzias Latipes* ». *Journal of Experimental Zoology* 290 (4): 402-10. <https://doi.org/10.1002/jez.1081>.
- Shinomiya, Ai, Minoru Tanaka, Tohru Kobayashi, Yoshitaka Nagahama, et Satoshi Hamaguchi. 2000. « The Vasa-like Gene, *Olvas*, Identifies the Migration Path of Primordial Germ Cells during Embryonic Body Formation Stage in the Medaka, *Oryzias Latipes* ». *Development, Growth and Differentiation* 42 (4): 317-26. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169x.2000.00521.x>.
- Silvestri, Ludovico, Irene Costantini, Leonardo Sacconi, et Francesco Saverio Pavone. 2016. « Clearing of Fixed Tissue: A Review from a Microscopist's Perspective ». *Journal of Biomedical Optics* 21 (8): 081205. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.8.081205>.
- Skinner, Michael K. 2005. « Regulation of Primordial Follicle Assembly and Development ». *Human Reproduction Update* 11 (5): 461-71. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi020>.

- Søkilde, Rolf, Inga Newie, Helena Persson, Åke Borg, et Carlos Rovira. 2015. « Passenger Strand Loading in Overexpression Experiments Using MicroRNA Mimics ». *RNA Biology* 12 (8): 787-91. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020270>.
- Sonigo, Charlotte, Stéphane Jankowski, Olivier Yoo, Olivier Trassard, Nicolas Bousquet, Michael Grynberg, Isabelle Beau, et Nadine Binart. 2018. « High-Throughput Ovarian Follicle Counting by an Innovative Deep Learning Approach ». *Scientific Reports* 8 (1): 13499. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31883-8>.
- Sontakke, Sadanand D, Bushra T Mohammed, Alan S McNeilly, et F Xavier Donadeu. 2014. « Characterization of MicroRNAs Differentially Expressed during Bovine Follicle Development ». *REPRODUCTION* 148 (3): 271-83. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0140>.
- Soygur, Bikem, et Diana J. Laird. 2021. « Ovary Development: Insights From a Three-Dimensional Imaging Revolution ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (juillet): 698315. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.698315>.
- Staton, Alison A, Holger Knaut, et Antonio J Giraldez. 2011. « MiRNA Regulation of Sdf1 Chemokine Signaling Provides Genetic Robustness to Germ Cell Migration ». *Nature Genetics* 43 (3): 204-11. <https://doi.org/10.1038/ng.758>.
- Steinkraus, Bruno R., Markus Toegel, et Tudor A. Fulga. 2016. « Tiny Giants of Gene Regulation: Experimental Strategies for MICRORNA Functional Studies ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 5 (3): 311-62. <https://doi.org/10.1002/wdev.223>.
- Stringer, Carsen, Tim Wang, Michalis Michaelos, et Marius Pachitariu. 2021. « Cellpose: A Generalist Algorithm for Cellular Segmentation ». *Nature Methods* 18 (1): 100-106. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>.
- Sumpter, J. P., Scott, A. P., Baynes, S. M., et Witthames, P. R. 1984. « Early stages of the reproductive cycle in virgin female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) ». *Aquaculture* 43: 235-42.
- Susaki, Etsuo A., Kazuki Tainaka, Dimitri Perrin, Fumiaki Kishino, Takehiro Tawara, Tomonobu M. Watanabe, Chihiro Yokoyama, et al. 2014. « Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis ». *Cell* 157 (3): 726-39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042>.
- Suzuki, Aya, Minoru Tanaka, et Naoki Shibata. 2004. « Expression Of Aromatase mRNA and Effects of Aromatase Inhibitor during Ovarian Development in the Medaka, *Oryzias Latipes* ». *Journal of Experimental Zoology* 301A (3): 266-73. <https://doi.org/10.1002/jez.a.20027>.
- Takahashi, Akiko, Shinji Kanda, Tomohiro Abe, et Yoshitaka Oka. 2016. « Evolution of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Regulation in Vertebrates Revealed by Knockout Medaka ». *Endocrinology* 157 (10): 3994-4002. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1356>.
- Takahashi, Takayuki, Chika Fujimori, Akane Hagiwara, et Katsueki Ogiwara. 2013. « Recent Advances in the Understanding of Teleost Medaka Ovulation: The Roles of Proteases and Prostaglandins ». *Zoological Science* 30 (4): 239-47. <https://doi.org/10.2108/zsj.30.239>.
- Takeda, Hiroyuki. 2008. « Draft Genome of the Medaka Fish: A Comprehensive Resource for Medaka Developmental Genetics and Vertebrate Evolutionary Biology: Draft Genome of the Medaka Fish ». *Development, Growth & Differentiation* 50 (avril): S157-66. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.00992.x>.
- Tanaka, Minoru, Masato Kinoshita, Daisuke Kobayashi, et Yoshitaka Nagahama. 2001. « Establishment of Medaka (*Oryzias Latipes*) Transgenic Lines with the Expression of Green Fluorescent Protein Fluorescence Exclusively in Germ Cells: A Useful Model to

- Monitor Germ Cells in a Live Vertebrate ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (5): 2544-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.041315498>.
- Tenugu, Swathi, Akanksha Pranoty, Sajwan-Khatri Mamta, et Balasubramanian Senthilkumaran. 2021. « Development and Organisation of Gonadal Steroidogenesis in Bony Fishes - A Review ». *Aquaculture and Fisheries* 6 (3): 223-46. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.09.004>.
- Thorsen, A, et O S Kjesbu. 2001. « A Rapid Method for Estimation of Oocyte Size and Potential Fecundity in Atlantic Cod Using a Computer-Aided Particle Analysis Systemq ». *Journal of Sea Research*, 14.
- Tohyama, Saki, Ogino Yukiko, Anke Lange, Taijun Myosho, Tohru Kobayashi, Yu Hirano, Gen Yamada, et al. 2017. « Establishment of estrogen receptor 1 ESR1 -knockout medaka : ESR1 is dispensable for sexual development and reproduction in medaka, *Oryzias latipes* ». *Dev Growth Differ* 59: 552-61.
- Toloubeydokhti, Tannaz, Orhan Bukulmez, et Nasser Chegini. 2008. « Potential Regulatory Functions of MicroRNAs in the Ovary ». *Seminars in Reproductive Medicine* 26 (06): 469-78. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1096127>.
- Tu, Jiajie, Albert Hoi-Hung Cheung, Clement Leung-Kwok Chan, et Wai-Yee Chan. 2019. « The Role of MicroRNAs in Ovarian Granulosa Cells in Health and Disease ». *Frontiers in Endocrinology* 10 (mars): 174. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00174>.
- Tyler, C. R., et J. P. Sumpter. 1996. « Oocyte Growth and Development in Teleosts ». *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6 (3): 287-318. <https://doi.org/10.1007/BF00122584>.
- Tyler, C. R., J. P. Sumpter, et P. R. Witthames. 1990. « The Dynamics of Oocyte Growth during Vitellogenesis in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) ». *Biology of Reproduction* 43: 202-9.
- Van Gansen, P, et A Schram. 1972. « EVOLUTION OF THE NUCLEOLI DURING OOGENESIS IN XENOPUS LAEVIS STUDIED BY ELECTRON MICROSCOPY ». *J. Cell. Sci.* 10 (339-367): 30.
- Volff, J-N. 2005. « Genome Evolution and Biodiversity in Teleost Fish ». *Heredity* 94 (3): 280-94. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800635>.
- Volkoff, Helene. 2016. « The Neuroendocrine Regulation of Food Intake in Fish: A Review of Current Knowledge ». *Frontiers in Neuroscience* 10 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00540>.
- Waisman, Ariel, Alessandra Marie Norris, Martín Elías Costa, et Daniel Kopinke. 2021. « Automatic and Unbiased Segmentation and Quantification of Myofibers in Skeletal Muscle ». *Scientific Reports* 11 (1): 11793. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91191-6>.
- Wallace, Robin A., et Kelly Selman. 1981. « Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts ». *American Zoologist* 21 (2): 325-43. <https://doi.org/10.1093/icb/21.2.325>.
- . 1990. « Ultrastructural Aspects of Oogenesis and Oocyte Growth in Fish and Amphibians ». *Journal of Electron Microscopy Technique* 16 (3): 175-201. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060160302>.
- Wang, Jiangang, Jili Chen, Fang Sun, Zhiwei Wang, Wenfang Xu, Yafeng Yu, Feng Ding, et Huajiang Shen. 2020. « MiR-202 Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma by Targeting HK2 ». *Oncology Letters*, janvier. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11334>.
- Wang, Xuegeng, Xiaohong Song, et Ramji K. Bhandari. 2020. « Distinct Expression Patterns of Seven Crucial MicroRNAs during Early Embryonic Development in Medaka (*Oryzias Latipes*) ». *Gene Expression Patterns* 37 (septembre): 119133. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2020.119133>.

- Watanabe, Akihiko, Emiko Kobayashi, Taku Ogawa, et Kazuo Onitake. 1998. « Fibroblast Growth Factor May Regulate the Initiation of Oocyte Growth in the Developing Ovary of the Medaka, *Oryzias Latipes* ». *Zoological Science* 15: 531-36.
- West, G. 1990. « Methods of Assessing Ovarian Development in Fishes: A Review ». *Marine and Freshwater Research* 41 (2): 199. <https://doi.org/10.1071/MF9900199>.
- Weigert, M., Schmidt, U., Boothe, T. et al. Content-aware image restoration: pushing the limits of fluorescence microscopy. *Nat Methods* 15, 1090–1097 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0216-7>
- Wightman, Bruce, Ilho Ha, et Gary Ruvkun. 1993. « Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *W-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans* ». *Cell* 75: 855-62.
- Wildner, Daniel Dantas, Harry Grier, et Irani Quagio-Grassiotto. 2013. « Female Germ Cell Renewal during the Annual Reproductive Cycle in Ostariophysians Fish ». *Theriogenology* 79 (4): 709-24. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.028>.
- Wittbrodt, Joachim, Akihiro Shima, et Manfred Schartl. 2002. « Medaka — a Model Organism from the Far East ». *Nature Reviews Genetics* 3 (1): 53-64. <https://doi.org/10.1038/nrg704>.
- Wong, Queenie Wing-Lei, Ming-An Sun, Shuk-Wa Lau, Chirag Parsania, Shaolong Zhou, Silin Zhong, et Wei Ge. 2018. « Identification and Characterization of a Specific 13-MiRNA Expression Signature during Follicle Activation in the Poisson-zèbre Ovary† ». *Biology of Reproduction* 98 (1): 42-53. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox160>.
- Wu, Xiaowen, Yingqing Zhang, Shumei Xu, Yuyang Chang, Yang Ye, Anning Guo, Yi Kang, et al. 2019. « Loss of *Gsdf* Leads to a Dysregulation of *Igf2bp3*-Mediated Oocyte Development in Medaka ». *General and Comparative Endocrinology* 277 (juin): 122-29. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.04.001>.
- Xie, Jiale, Ying Zhong, Yuli Zhao, Wenjie Xie, Jing Guo, Lang Gui, et Mingyou Li. 2022. « Characterization and Expression Analysis of Gonad Specific *Igf3* in the Medaka Ovary ». *Aquaculture and Fisheries* 7 (3): 259-68. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.07.018>.
- Xie, Yuxin, Duo Huang, Lianhe Chu, Yun Liu, Xiao Sun, Jianzhen Li, et Christopher H K Cheng. 2021. « *Igf3* Is Essential for Ovary Differentiation in Poisson-zèbre† ». *Biology of Reproduction* 104 (3): 589-601. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa218>.
- Xiong, Shuting, Jinsong Tian, Si Ge, Zhi Li, Zhe Long, Wenjie Guo, Yan He, Tiaoyi Xiao, Jian-Fang Gui, et Jie Mei. 2020. « The MiRNA-200 Cluster on Chromosome 23 Is Required for Oocyte Maturation and Ovulation in Poisson-zèbre ». *Biology of Reproduction* 103 (4): 769-78.
- Xu, Fangfang, Hui Li, et Chengjiu Hu. 2019. « MiR-202 Inhibits Cell Proliferation, Invasion, and Migration in Breast Cancer by Targeting *ROCK1* Gene ». *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (9): 16008-18. <https://doi.org/10.1002/jcb.28879>.
- Yamamoto, Kiichiro, et Fumio Yamazaki. 1961. « RHYTHM OF DEVELOPMENT IN THE OOCYTE OF THE GOLD-FISH, *CARASSIUS AURATUS* ». *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, 24.
- Yamamoto, Kiichiro, et Hiroshi Yoshioka. 1964. « RHYTHM OF DEVELOPMENT IN THE OOCYTE OF THE MEDAKA, *ORYZIAS LATIPES* ». *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 15 (1): 5-19.
- Yan, Yi-Lin, Thomas Desvignes, Ruth BreMiller, Catherine Wilson, Danielle Dillon, Samantha High, Bruce Draper, Charles Loren Buck, et John Postlethwait. 2018. « The Gonadal Soma Controls Ovarian Follicle Proliferation through *Gsdf* in Poisson-zèbre », 42.
- Yang, Bin, Jennifer B. Treweek, Rajan P. Kulkarni, Benjamin E. Deverman, Chun-Kan Chen, Eric Lubeck, Sheel Shah, Long Cai, et Viviana Gradinaru. 2014. « Single-Cell

- Phenotyping within Transparent Intact Tissue through Whole-Body Clearing ». *Cell* 158 (4): 945-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.017>.
- Yang, Chao, Chencheng Yao, Ruhui Tian, Zijue Zhu, Liangyu Zhao, Peng Li, Huixing Chen, et al. 2019. « MiR-202-3p Regulates Sertoli Cell Proliferation, Synthesis Function, and Apoptosis by Targeting LRP6 and Cyclin D1 of Wnt/ β -Catenin Signaling ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 14 (mars): 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.10.012>.
- Zayed, Yara, Xin Qi, et Chun Peng. 2019. « Identification of Novel MicroRNAs and Characterization of MicroRNA Expression Profiles in Poisson-zèbre Ovarian Follicular Cells ». *Frontiers in Endocrinology* 10 (juillet): 518. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00518>.
- Zhang, Hua, et Kui Liu. 2015. « Cellular and Molecular Regulation of the Activation of Mammalian Primordial Follicles: Somatic Cells Initiate Follicle Activation in Adulthood ». *Human Reproduction Update* 21 (6): 779-86.
- Zhang, Hua, Sanjiv Risal, Nagaraju Gorre, Kiran Busayavalasa, Xin Li, Yan Shen, Benedikt Bosbach, Mats Brännström, et Kui Liu. 2014. « Somatic Cells Initiate Primordial Follicle Activation and Govern the Development of Dormant Oocytes in Mice ». *Current Biology* 24 (21): 2501-8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.023>.
- Zhang, Jinbi, Yinxue Xu, Honglin Liu, et Zengxiang Pan. 2019. « MicroRNAs in Ovarian Follicular Atresia and Granulosa Cell Apoptosis ». *Reproductive Biology and Endocrinology* 17 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0450-y>.
- Zhang, Jing, Wei Liu, Yilin Jin, Peng Jia, Kuntong Jia, et Meisheng Yi. 2017. « MiR-202-5p Is a Novel Germ Plasm-Specific MicroRNA in Poisson-zèbre ». *Scientific Reports* 7 (1): 7055. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07675-x>.
- Zhang, Xiaowei, Markus Hecker, Paul D. Jones, John Newsted, Doris Au, Richard Kong, Rudolf S. S. Wu, et John P. Giesy. 2008. « Responses of the Medaka HPG Axis PCR Array and Reproduction to Prochloraz and Ketoconazole ». *Environmental Science & Technology* 42 (17): 6762-69. <https://doi.org/10.1021/es800591t>.
- Zhang, Zhiwei, Shuk-Wa Lau, Lingling Zhang, et Wei Ge. 2015. « Disruption of Poisson-zèbre Follicle-Stimulating Hormone Receptor (Fshr) But Not Luteinizing Hormone Receptor (Lhcgr) Gene by TALEN Leads to Failed Follicle Activation in Females Followed by Sexual Reversal to Males ». *Endocrinology* 156 (10): 3747-62. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1039>.
- Zhao, Han, et Aleksandar Rajkovic. 2008. « MicroRNAs and Mammalian Ovarian Development ». *Seminars in Reproductive Medicine* 26 (06): 461-68. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1096126>.
- Zhao, Jia, Deguang Ding, et Ge Zhao. 2019. « Reduced MiR-202 Levels Enhanced Oral Cancer Development via Targeting Sp1 ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 18: 489-96. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7603>.
- Zheng, Yan, Lei Xie, Shuwen Xu, Weidong Yan, Hongzhen Zhang, Yali Meng, Jingqiao Liu, et Xujing Wei. 2021. « Effects of MiR-202-5p Silencing PIK3CA Gene Expression on Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition of Cervical Cancer SiHa Cells through Inhibiting PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathway Activation ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 476 (11): 4031-44. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04211-4>.
- Zhu, Bo, Lakhansing Pardeshi, Yingying Chen, et Wei Ge. 2018. « Transcriptomic Analysis for Differentially Expressed Genes in Ovarian Follicle Activation in the Poisson-zèbre ». *Frontiers in Endocrinology* 9 (octobre): 593. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00593>.
- Zhuang, Donghai, Li Liang, Hongzhan Zhang, et Xianguang Feng. 2020. « MiR-202 Suppresses Hepatocellular Carcinoma Progression via Downregulating BCL2

Expression ». *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 28 (4): 399-408. <https://doi.org/10.3727/096504020X15864296270581>.

ANNEXES

Annexe 1 : Table de développement embryonnaire du médaka extraite de (Iwamatsu, 2004)

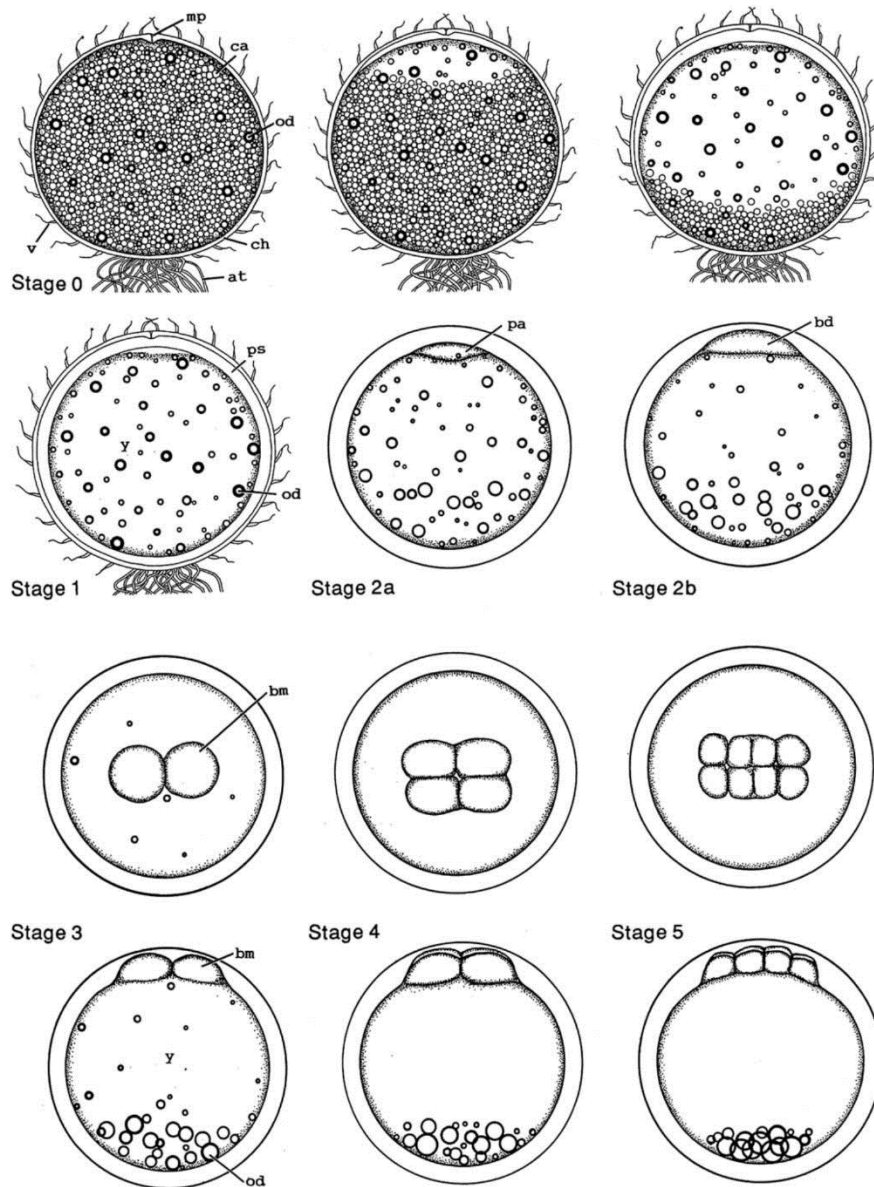


Fig. 1. ab, swim (air) bladder; af, anal fin; ag, artery globe; an, anus; at, attaching filament; bc, body cavity; bd, blastodisc; bi, blood island; bl, beak-like mass of cells; bm, blastomeres; br, branchiostegal ray; bv, blood vessel; ca, cortical alveolus; cd, Cuvierian duct; cf, caudal fin; ch, chorion; cn, cornea; cv, caudal vein; da, dorsal aorta; df, dorsal fin; dl, dorsal lip of blastopore; ea, otic (ear) vesicle; em, embryonic body; ev, otic (ear) vesicle rudiment; ey, optic (eye) vesicle; fb, fore-brain; fr, fin ray; g, gill; gb, gallbladder; gp, guanophores; gt, gut tube; h, heart rudiment; ha, atrium of heart; hb, hind-brain; hg, hatching gland cell; hv, ventricle of heart; kv, Kupffer's vesicle; l, lens; lj, lower jaw; lv, liver; mb, mid-brain; mc, marginal cell; mf, membranous fin (fin fold); ml, membrane labyrinth; mp, micropyle; mv, median yolk vein; n, naris; no, notochord; od, oil droplet; o, operculum; op, olfactory pit; ot, otolith; pa, protoplasmic accumulation; pb, protobrain; pf, pectoral fin; pi, pineal gland; pn, nucleus of periblast; pr, pronephros; ps, perivitelline space; s, scale; sc, spinal cord; sm, somite; sp, spleen; uj, upper jaw; uo, urinogenital orifice; v, non-attaching filament; vf, ventral fin; vl, vein of liver; y, yolk sphere.

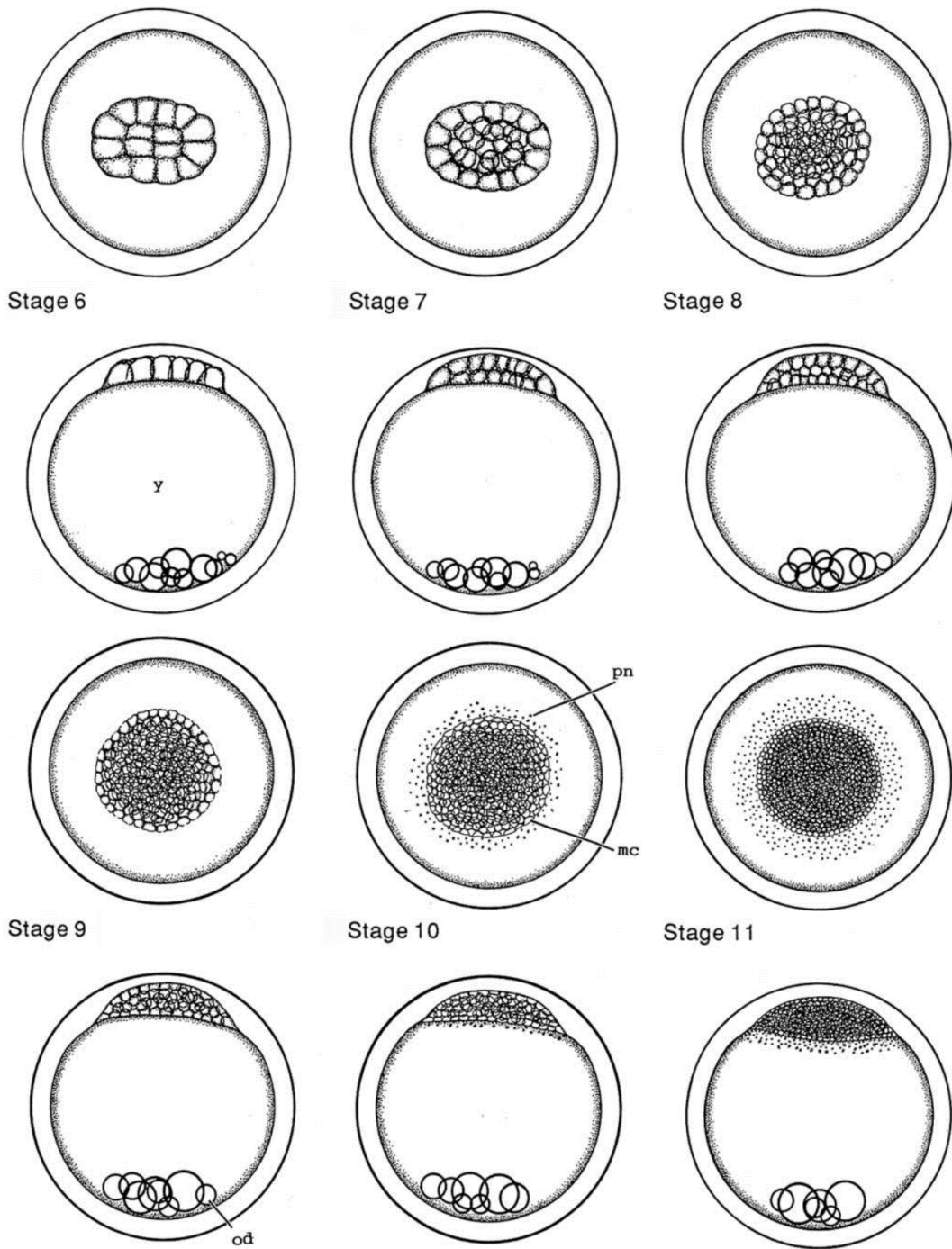


Fig. 1 (continued)

T. Iwamatsu / Mechanisms of Development 121 (2004) 605–618

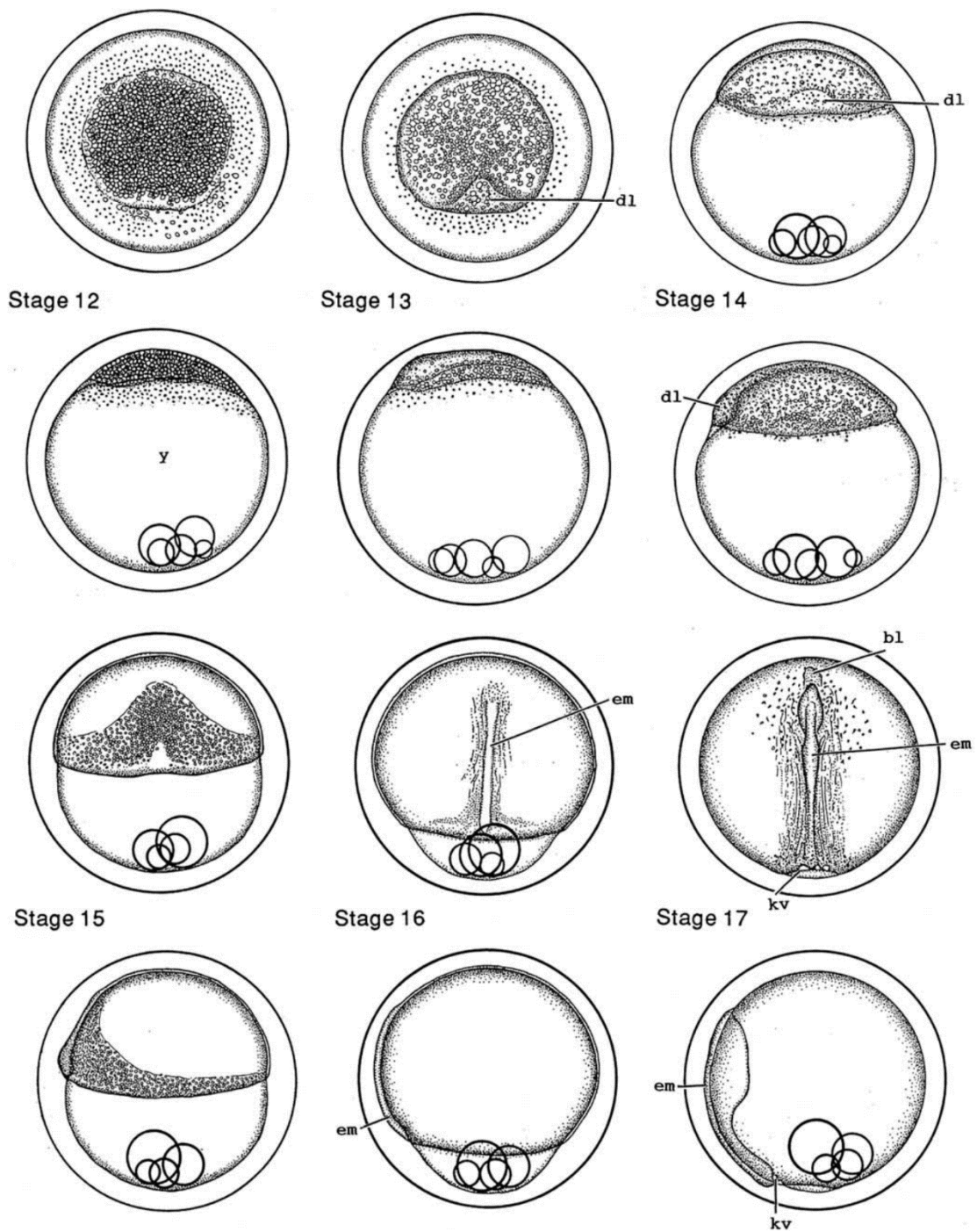


Fig. 1 (continued)

T. Iwamatsu / Mechanisms of Development 121 (2004) 605–618

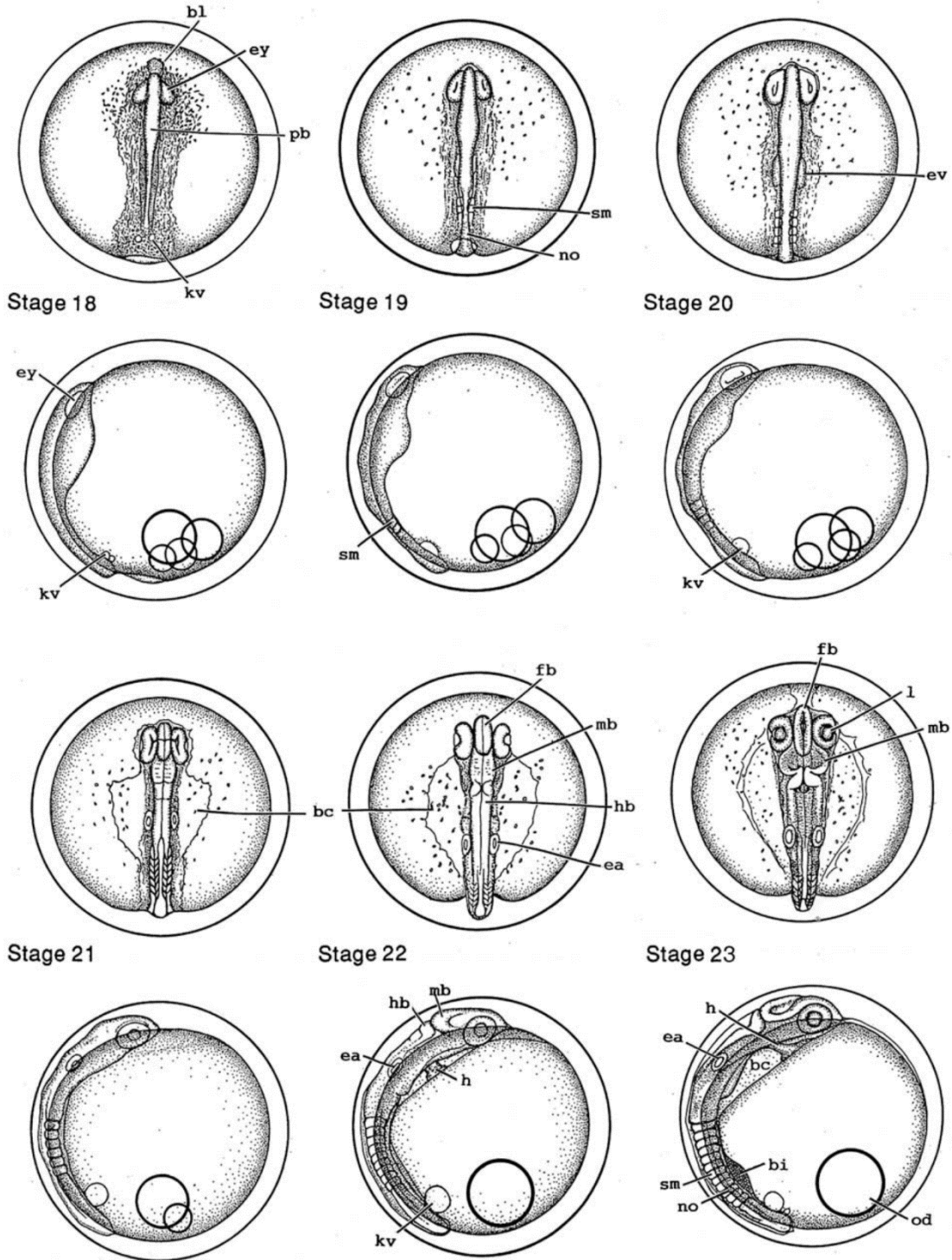


Fig. 1 (continued)

T. Iwamatsu / Mechanisms of Development 121 (2004) 605–618

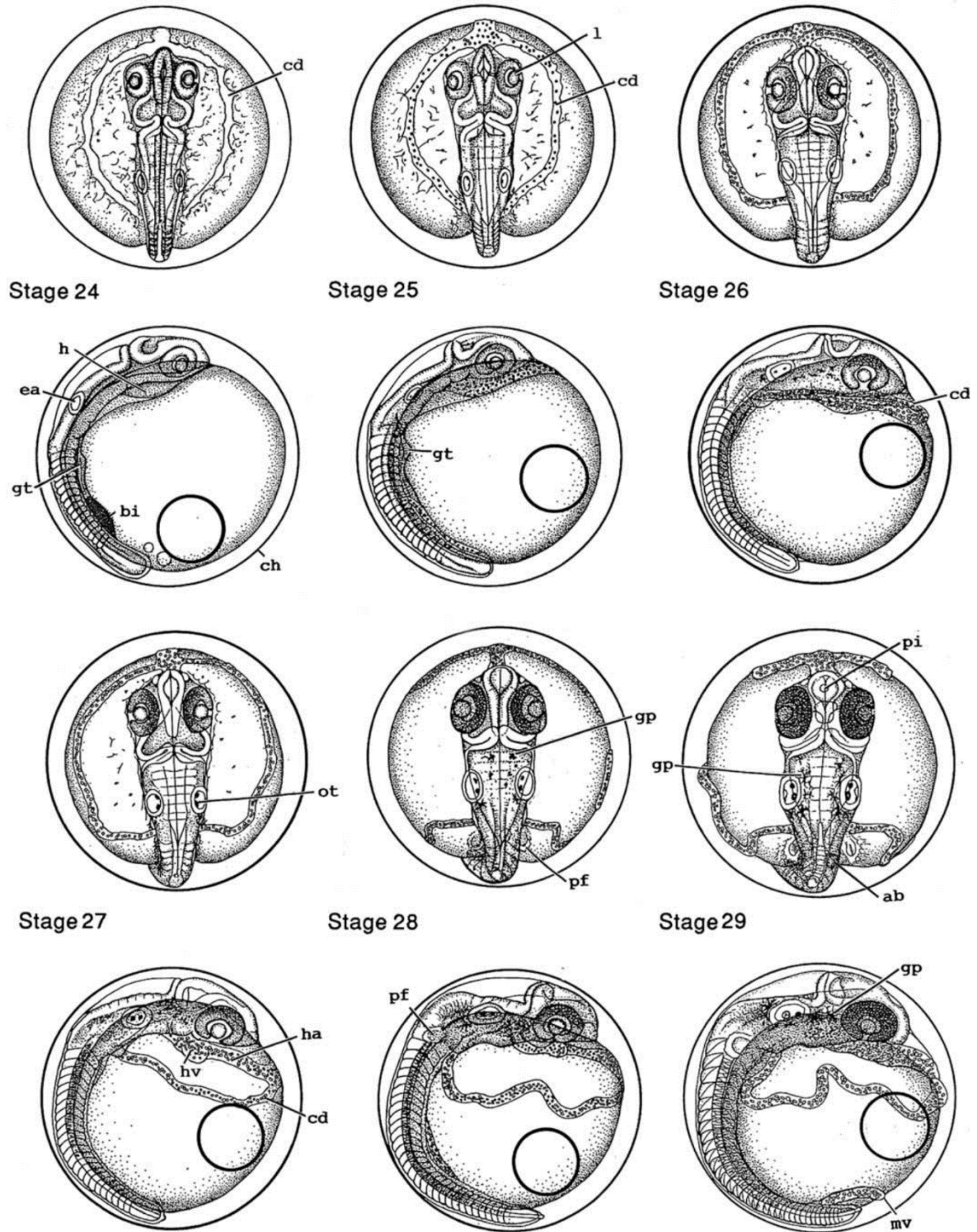


Fig. 1 (continued)

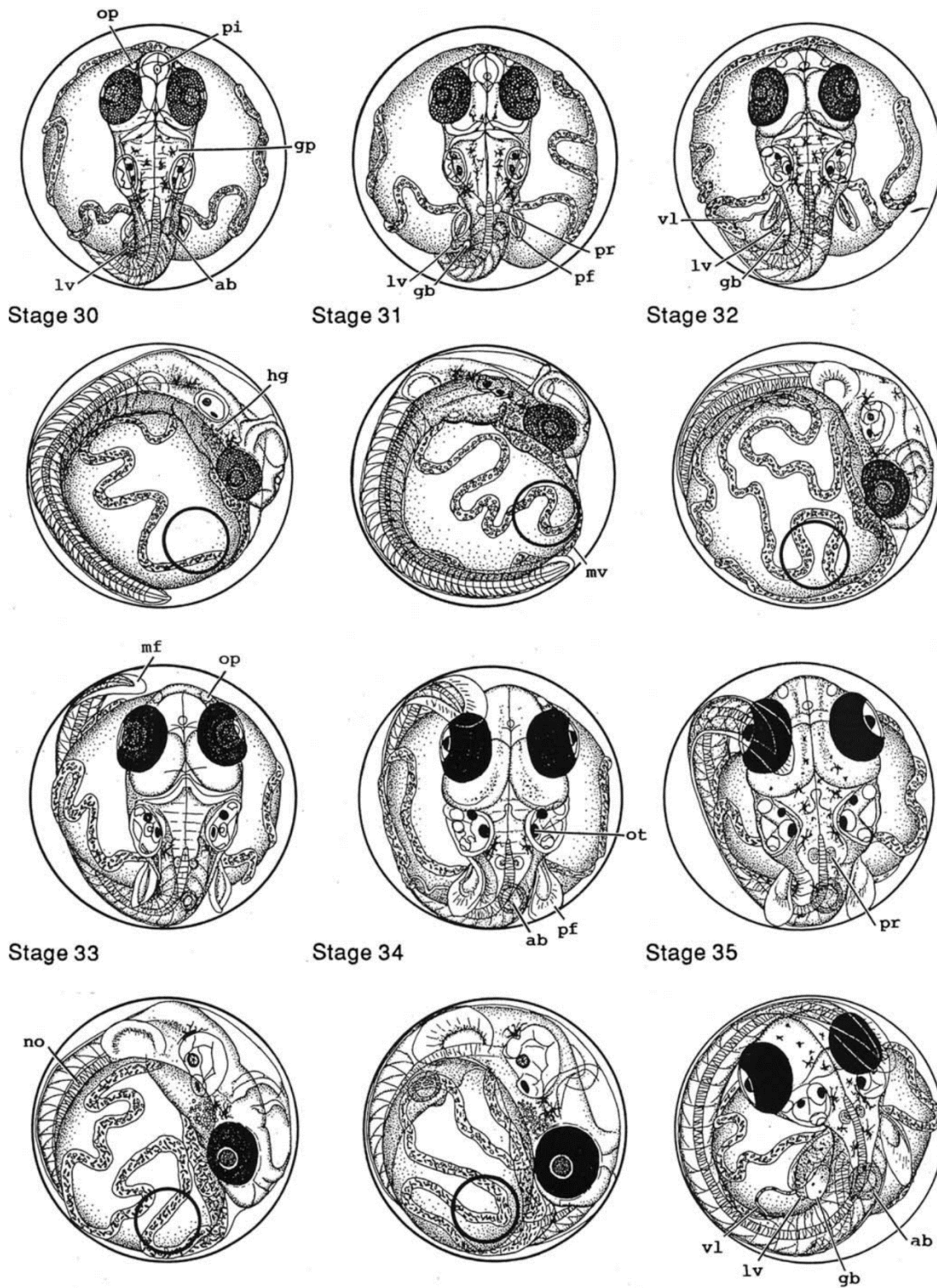


Fig. 1 (continued)

T. Iwamatsu / Mechanisms of Development 121 (2004) 605–618

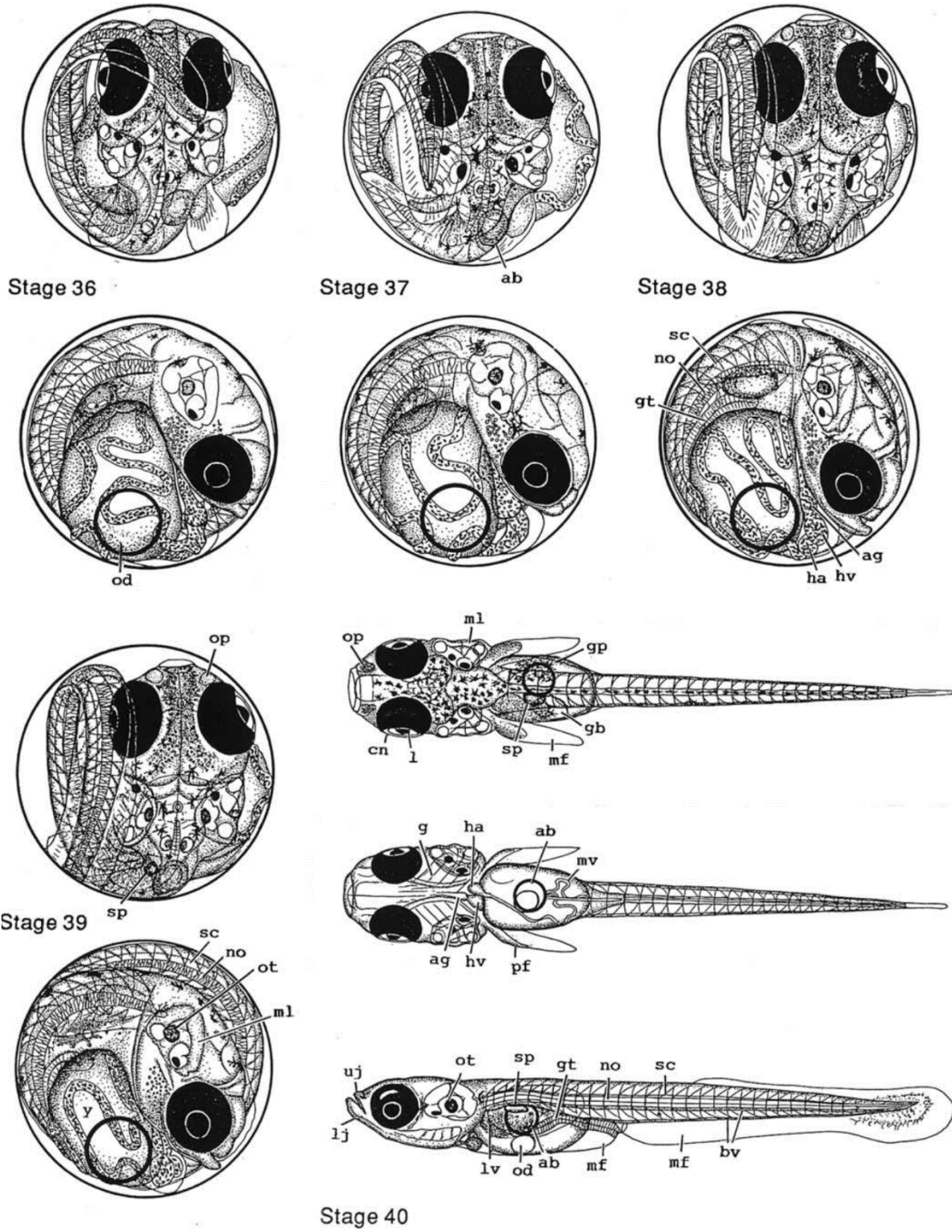


Fig. 1 (continued)

T. Iwamatsu / Mechanisms of Development 121 (2004) 605–618

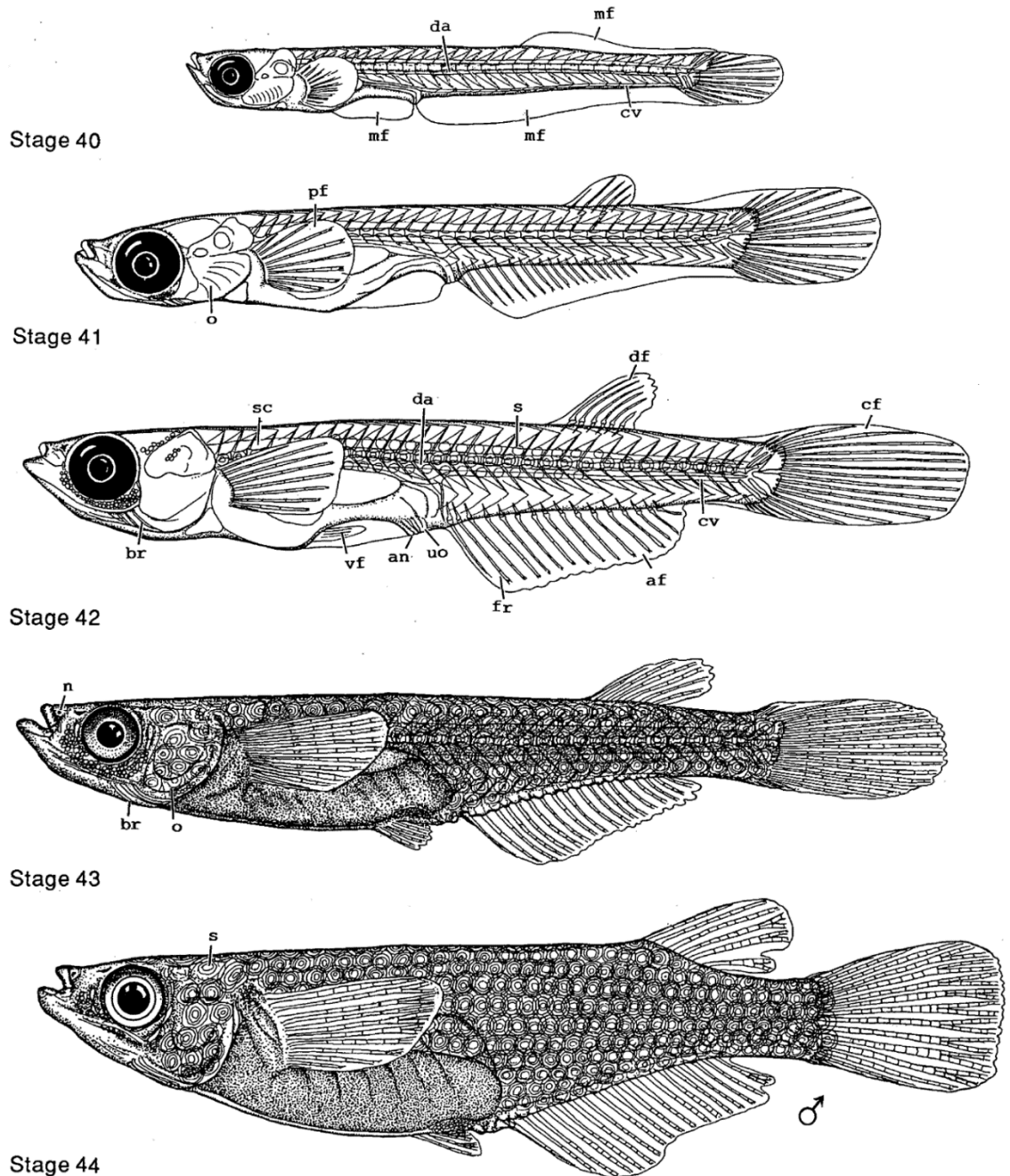


Fig. 1 (continued)

Annexe 2 : Table de développement des ovocytes chez le médaka (*Oryzias latipes*). (Takashi Iwamatsu 1988)

370

T. IWAMATSU, T. OHTA *et al.*

TABLE 2. Characteristics of the

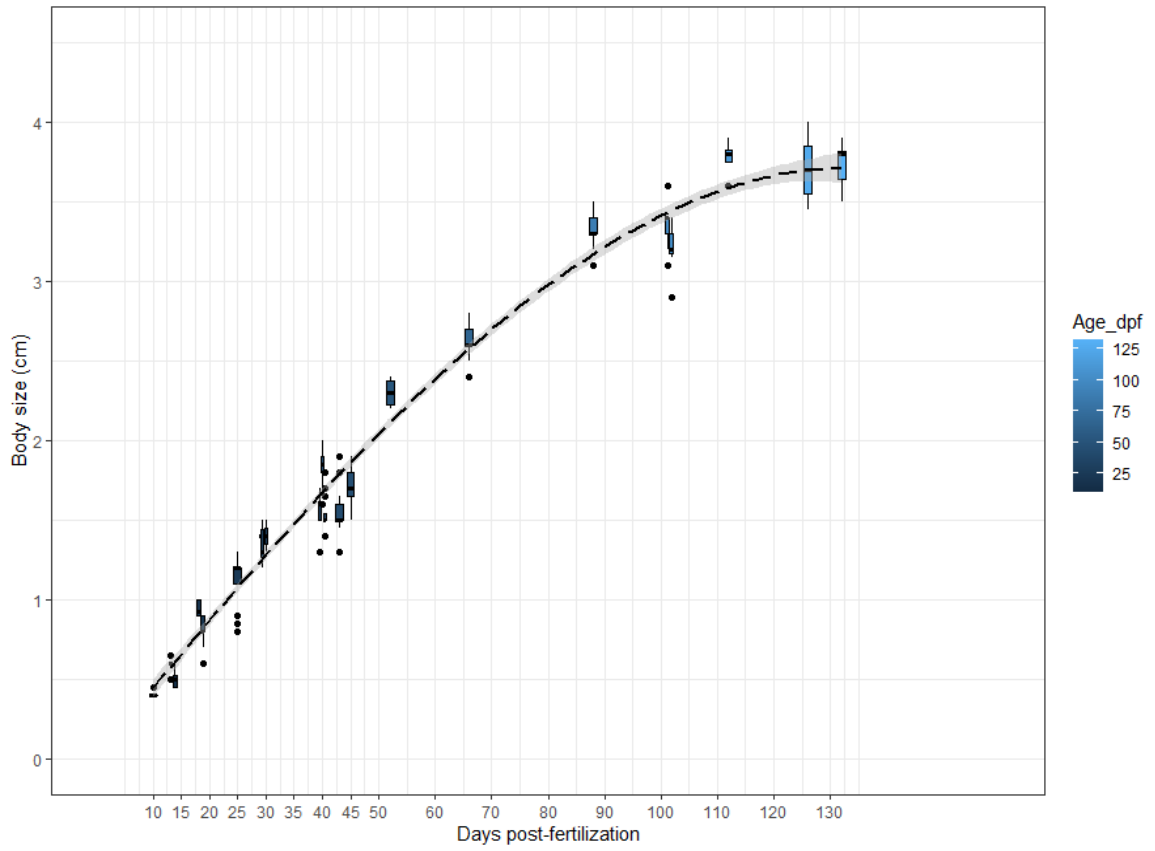
Phase	Stage	Follicle size (μm)	General appearance	Nucleus	
Previtellogenic	Early	I	20 to 60	Centrally located and roughly spherical. Nucleoli and chromatin-threads with network appearance	
		II	61 to 90	Transparent cytoplasm and nucleus with round nucleoli clearly visible	Centrally located with peripheral nucleoli and thin lamp-brush chromosomes
	Late	III	91 to 120		Centrally located. Folded envelope. Voluminous nucleoli irregular in shape. Developed lamp-brush chromosomes
		IV	121 to 150	Transparent cytoplasm and nucleus with irregular shaped nucleoli clearly visible. Rudiments (bright spots) of short villi on chorion	Centrally located. Folded envelope. Voluminous nucleoli ring-shaped. Developed lamp-brush chromosomes
Vitellogenic	Early	V	151 to 250	Transparent cytoplasm and nucleus with ring-shaped nucleoli. Elongated short villi and attaching filaments on chorion	Folded envelope. Nucleoplasm strongly stainable with haematoxylin. Lamp-brush chromosomes thicker and shorter. Ring-shaped nucleoli
		VI	251 to 400	Transparent cytoplasm. Attaching filaments opaque in vegetal hemisphere	
	Late	VII	401 to 500	Attaching filaments opaque in vegetal hemisphere. Dark lipid granules in perinuclear region of cytoplasm filled with vacuoles (yolk vesicles) and oil droplets	Very irregular in shape. Displaced toward animal pole. Shortened chromosomes. Reduced in volume. Nucleoplasm strongly stainable with haematoxylin.
		VIII	501 to 800	Cortical alveoli (yolk vesicles) and oil droplets dimly visible in translucent cytoplasm surrounding yolk sphere	Located at animal pole. Condensed chromosomes massed in center of nucleoplasm
Post-vitellogenic	Maturation	IX	801 to 1200	Cortical alveoli and oil droplets clearly seen in light cortical cytoplasm. A large germinal vesicle visible near micropyle until resumption of meiosis	Apparent large vacuole within outer nuclear envelope at ovarian surface side. Nucleoli and nuclear envelope disappear with resumption of meiosis
	Ovulated	X	1200*	Projecting short villi and attaching filaments on chorion. Transparent and light cytoplasm clearly showing cortical alveoli and oil droplets	Second metaphase figure at animal pole in cortical cytoplasm

*Egg.

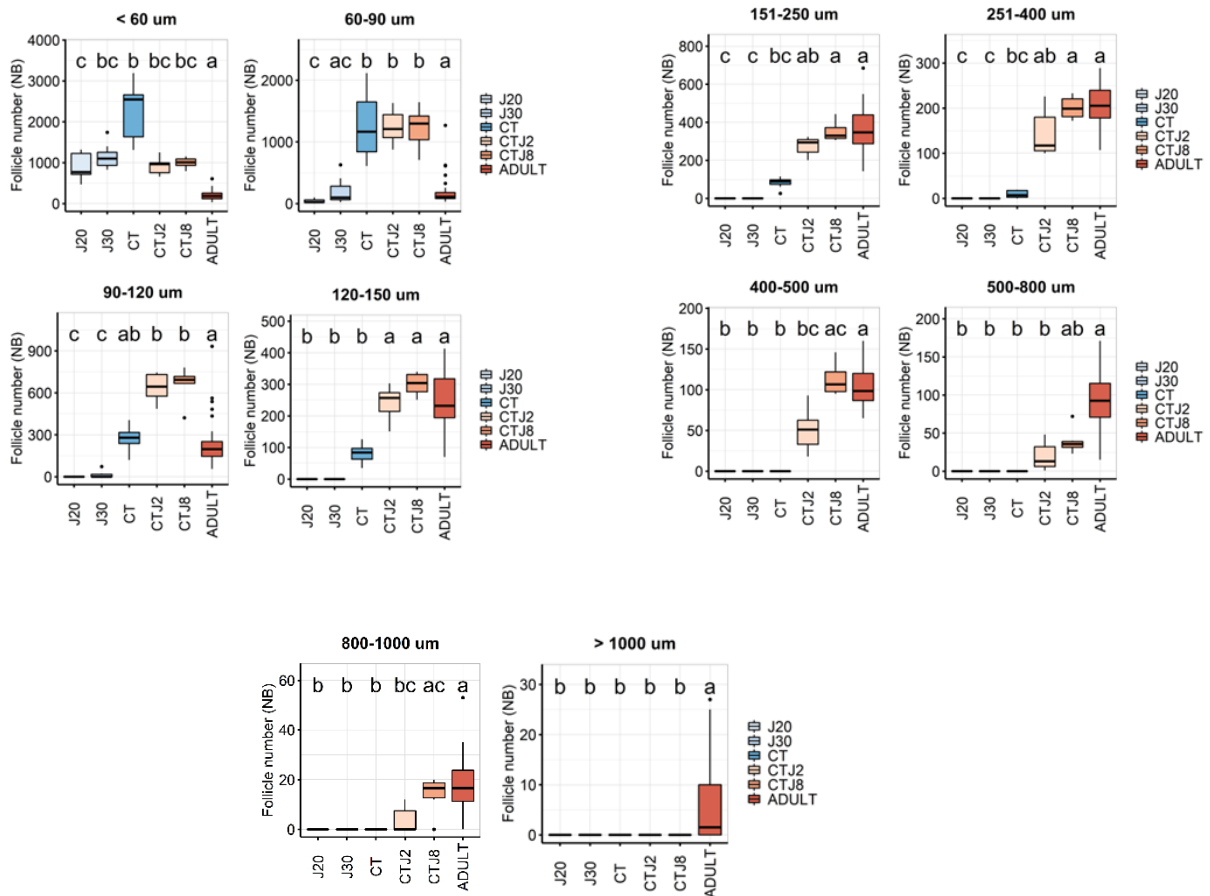
various stages of oocyte development

Cytoplasm	Chorion	Follicle cells
A few microvilli and small number of poorly developed ER and mitochondria	Absent	Extremely flat
Clusters of long microvilli (cytoplasmic projections). Yolk nucleus, a small number of mitochondria and ER. Electron-dense cortex	Absent	A single layer each of thecal and granulosa cells. Desmosomes developed between adjacent granulosa cells
Cytoplasmic projections evenly distributed on whole surface. Yolk nucleus, increased mitochondria and ER. Faintly stainable with haematoxylin	Outermost layer rudiments among cytoplasmic projections of oocyte. Short villi bumps appear	
Most developed yolk nucleus. Increased mitochondria in cortex. Faintly stainable with haematoxylin	Outermost layer (0.2–0.3 μm) rudiments among long cytoplasmic projections. Elongated short villi. Differentiation of attaching filaments	Granulosa cells thick at attaching filament side
Elongated cytoplasmic projections. Broken yolk nucleus and a single layer of small yolk vesicles	Outermost layer 0.2–0.6 μm in thickness. Two layers at end of this stage	Micropylar cell detectable
Very elongated cytoplasmic projections. Two to several layers of large yolk vesicles occupy most of cytoplasm. Lipid granules at perinuclear region and dense yolk granules	Outermost layer 0.5–0.6 μm and innermost layer 1.5–3 μm . Micropyle incomplete	Thick granulosa cells in vegetal hemisphere. E_2 production
Cytoplasmic projections irregularly contact with granulosa cells by gap junctions. Yolk vesicles fully occupy cytoplasm. Small yolk masses among yolk vesicles. Increased oil droplets	Thick in animal hemisphere. Outermost layer 0.6 μm and innermost layer about 4 μm	E_2 production responsive to gonadotropic stimulation
Most elongated cytoplasmic projections. Yolk vesicles and oil droplets aligned in a single layer in cortex. Central yolk mass occupies most of cytoplasm.	Very long attaching filaments at vegetal pole region, coiled around vegetal hemisphere. Ten μm in total thickness	$17\alpha, 20\beta\text{-DiOHprog}$ and E_2 production responsive to gonadotropic stimulation
Cortical alveoli (yolk vesicles), oil droplets, mitochondria, vesicular ER, Golgi complexes, annulate lamellae and multivesicular bodies in thin cortex	Cytoplasmic projections withdrawn at end of this stage	Nucleus located at side of basement membrane. Sifted off at end of this stage (micropyle open). E_2 and $17\alpha, 20\beta\text{-diOHprog}$ production
Transparent and light cytoplasm showing clearly cortical alveoli and oil droplets	Projecting short villi and attaching filaments on chorion. Innermost layers showing a stratiform state (12–14 layers)	Absent

Annexe 3 : Tailles tête queue des femelles médaka et taux de croissance au cours du cycle de vie chez les individus sauvages

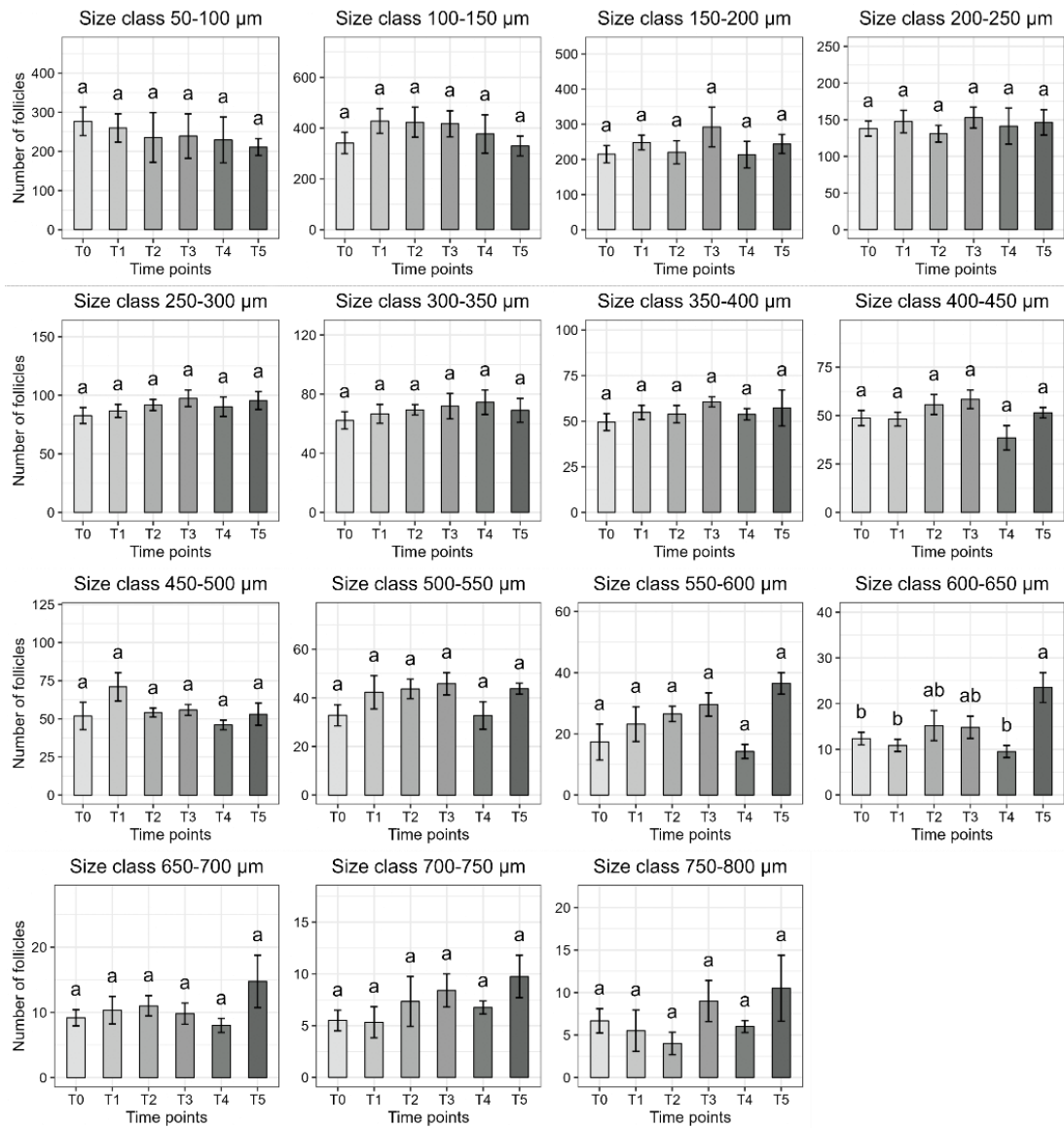


Annexe 4 : Nombre absolu de follicules dénombrés par stades de l'ovogenèse au cours du cycle de vie et table de proportion de follicules dans les compartiments de pré-vitellogenèse, vitellogenèse et post-vitellogenèse chez les individus sauvages

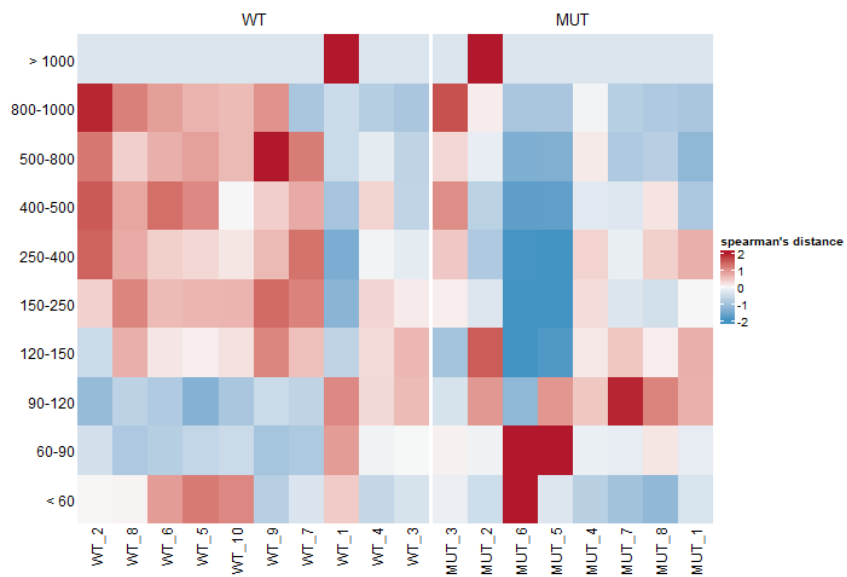


Time	Stage	Pre-vitellogenesis (Pv)						Vitellogenesis (V)					Post-vitellogenesis (PoV)					
		Early			Late			Early			Late		IX	X	Total PoV			
		I	II	(I + II)	III	IV	(III + IV)	Pv2	Total Pv	V	VI	(V + VI)				VII	VIII	(VII + VIII)
< 60	60-90	Pv1	90-120	120-150			150-250	250-400	(V + VI)	V1	400-500	500-800	V2		800-1000	> 1000		
	ADULT	12	10	22	13	15	28	50	23	13	35,6	7	6	13	48	1	0	2
	CTJ8	26	31	57	17	8	25	81	9	5	14	3	1	4	18	0	0	0
	CTJ2	26	35	61	18	7	25	86	8	4	12	1	1	2	14	0	0	0
	CT	57	31	88	7	2	9	97	2	0	3	0	0	0	3	0	0	0
	J30	87	12	99	1	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	J20	96	4	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

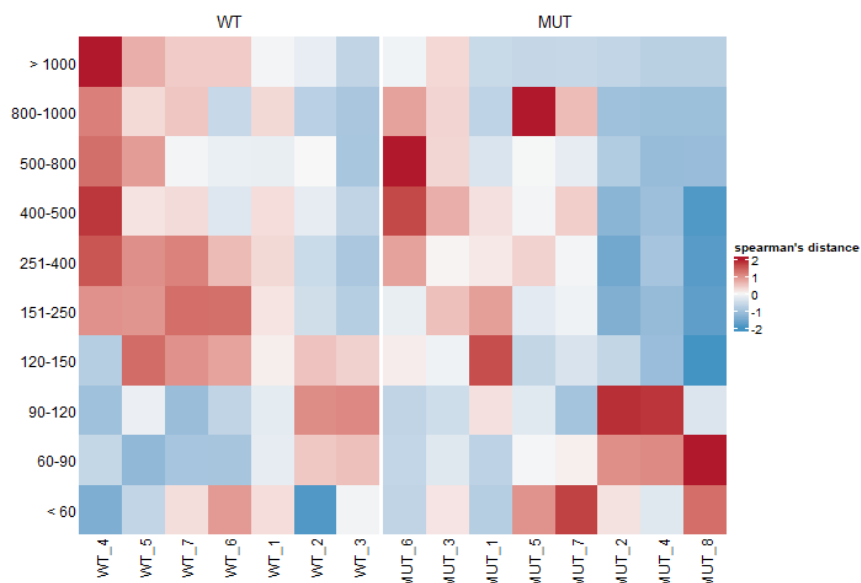
Annexe 5 : Distribution folliculaire par classes de 50µm au cours d'un cycle de reproduction de 24h chez l'adulte sauvage (pré-vitellogenèse et vitellogenèse)



Annexe 6 : Distributions des follicules par stades de l'ovogenèse et variabilité inter-individus chez la lignée sauvage et mutante *miR-202-KO* au temps T0 du cycle de reproduction chez l'adulte



Annexe 7 : Distributions des follicules par stades de l'ovogenèse et variabilité inter-individus chez la lignée sauvage et mutante *miR-202-KO* au temps T4 du cycle de reproduction chez l'adulte



Annexe 8 : Liste d'articles rétractés concernant le *miR-202*

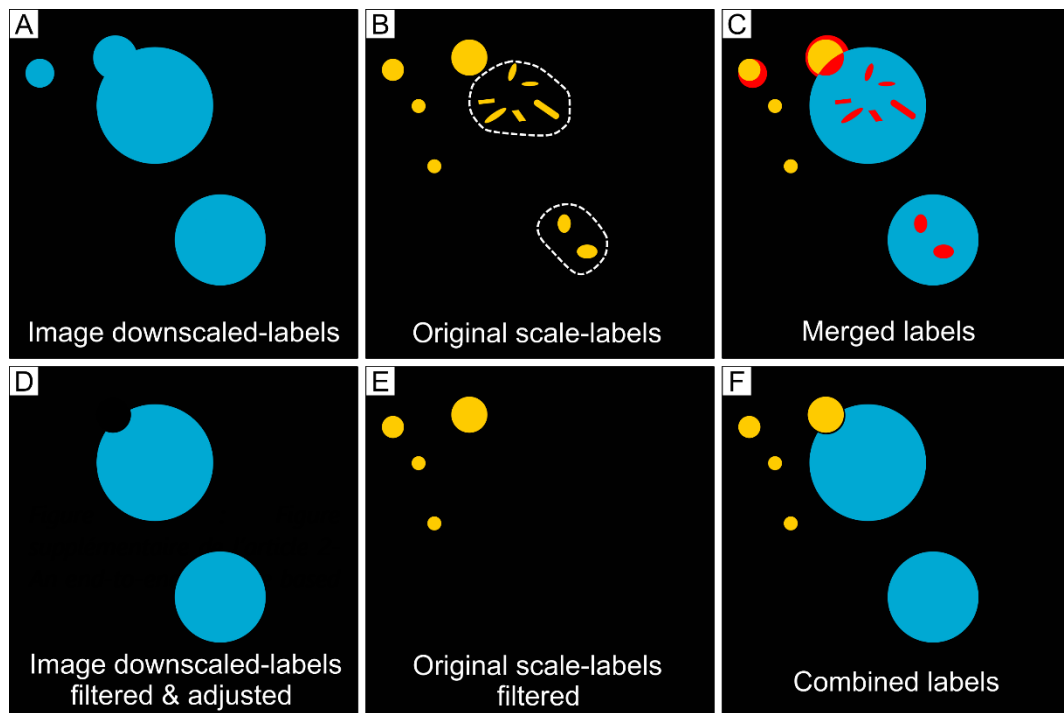
1: Chen P, Xing T, Wang Q, Liu A, Liu H, Hu Y, Ji Y, Song Y, Wang D. MicroRNA-202 inhibits cell migration and invasion through targeting FGF2 and inactivating Wnt/ β -catenin signaling in endometrial carcinoma. *Biosci Rep.* 2019 Oct 30;39(10):BSR20190680. doi: 10.1042/BSR20190680. **Retraction in:** *Biosci Rep.* 2022 Nov 30;42(11): PMID: 31533968; PMCID: PMC6822492.

3: Zhao Z, Lv B, Zhang L, Zhao N, Lv Y. **[Retracted]** miR-202 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting STAT3. *Mol Med Rep.* 2022 Oct;26(4):295. doi: 10.3892/mmr.2022.12811. Epub 2022 Aug 3. PMID: 35920186; PMCID: PMC9434999.

4: Yang J, Fan B, Zhao Y, Fang J. MicroRNA-202 inhibits cell proliferation, migration and invasion of glioma by directly targeting metadherin. *Oncol Rep.* 2017 Sep;38(3):1670-1678. doi: 10.3892/or.2017.5815. Epub 2017 Jul 13. **Retraction in:** *Oncol Rep.* 2022 Jul;48(1): PMID: 28714009.

6: Wu HY, Wu JL, Ni ZL. Overexpression of microRNA-202-3p protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through activation of TGF- β 1/Smads signaling pathway by targeting TRPM6. *Cell Cycle.* 2019 Mar;18(5):621-637. doi: 10.1080/15384101.2019.1580494. Epub 2019 Feb 27. **Retraction in:** *Cell Cycle.* 2022 Apr;21(7):759. PMID: 30810438; PMCID: PMC6464590.

Annexe 9 : Figure supplémentaire de l'article 2- An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of Medaka ovaries



Supplemental Figure 1: Post-processing strategy for combination and filtration of different label size.

Artificially generated images representing labels segmented with Cellpose diameter 30. Large labels (blue) are well segmented on downscaled image data (A). (B) Segmentation results from original scale image data shows well segmented small labels (yellow) while large labels are over-segmented (dotted lines). (C) Merged labels image show overlaps and wrong labels (red). (D) Label filtration preserves only largest labels on downscaled image results. Labels are adjusted to avoid loss of nearby small labels. (E) Small labels filtered. (F) Combined small and large labels.

Liste des publications et communications

- Publications

Manon Lesage, Manon Thomas, Jérôme Bugeon, Adèle Branthonne, Stéphanie Gay, Emilie Cardona, Marie Haghebaert, Fabrice Mahé, Julien Bobe, Violette Thermes, C-ECi: a CUBIC-ECi combined clearing method for three-dimensional follicular content analysis in the fish ovary, ***Biology of Reproduction***, Volume 103, Issue 5, November 2020, Pages 1099–1109, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa142>

Manon Lesage, Jérôme Bugeon, Manon Thomas, Thierry Pécot, Violette Thermes, An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of Medaka ovaries. bioRxiv 2022.08.03.502611; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.03.502611> (**en révision dans *Development***)

- Congrès internationaux

Manon Lesage, Jérôme Bugeon, Manon Thomas, Stéphanie Gay, Thierry Pécot, et al.. A comprehensive 3D approach to unravel follicular growth dynamics that governs fecundity in medaka fish (*Oryzias latipes*). **14. International Congress on the Biology of Fish (ICBF)**, Jun 2022, Montpellier, France. ([hal-03764407](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03764407))

Manon Lesage, Jérôme Bugeon, Manon Thomas, Stéphanie Gay, Julien Bobe, Violette Thermes. Analyzing the role of miR-202 in granulosa cells proliferation in female medaka (*Oryzias latipes*). **11th European zebrafish meeting (EZM)**, October 26-27 2020, Prague. (Virtual, Poster)

- Congrès nationaux

Manon Lesage, Jérôme Bugeon, Manon Thomas, Violette Thermes. Utilisation d'outils d'intelligence artificielle pour la segmentation d'images 3D d'ovaire de poisson. **17. Colloque de la Société Française de Microscopies**, Jul 2021, Reims, France. ([hal-03299572](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03299572))

Manon Lesage, Jérôme Bugeon, Manon Thomas, Thierry Pecot, Violette Thermes. Mise en application d'algorithmes open source de deep-learning pour l'analyse d'images 3D d'ovaires de médaka. **11èmes Journées Scientifiques et Techniques du réseau des Microscopistes INRAE**, Nov 2022, Rennes, France.

Titre : Exploration tridimensionnelle des aspects dynamiques de l'ovogenèse et de sa régulation par le miR-202 chez le médaka *Oryzias latipes*.

Mots clés : Ovogenèse, dynamique, miRNA, miR-202, microscopie 3D, médaka

Résumé : L'ovaire est caractérisé par des processus de croissance, de stockage et de recrutement des ovocytes entraînant d'importants réarrangements cellulaires au cours du cycle de vie de la femelle. Chez le médaka *Oryzias latipes*, comme chez d'autres poissons téléostéens, ces mécanismes d'ovogenèse sont mal compris d'un point de vue quantitatif et restent souvent extrapolés à partir de fractions de l'organe entier. Par conséquent, la connaissance de la dynamique des populations d'ovocytes dans l'ovaire est limitée, alors qu'elle est essentielle pour comprendre la régulation de la fertilité, notamment chez les espèces à intervalles de ponte courts comme le médaka. Pour y remédier, nous avons développé une méthode d'analyse des ovaires entiers qui est exhaustive, accessible et également transférable à d'autres espèces. En combinant la transparence des tissus, la microscopie confocale 3D et l'analyse d'images assistée par des algorithmes d'apprentissage profond, notre méthode a permis d'extraire des données quantitatives et morphologiques à différents stades de développement. L'analyse de l'évolution du contenu ovarien au cours du temps a révélé l'établissement de différentes réserves folliculaires au cours de la croissance/maturation de la femelle, indiquant la présence de deux recrutements majeurs qui alimentent progressivement une distribution folliculaire asynchrone chez l'adulte reproducteur. L'étude de la lignée miR-202-KO, dont la fertilité est réduite, a mis en évidence l'importance du maintien de la distribution asynchrone des follicules pour l'établissement d'un taux de fertilité normal. Les dérégulations des profils de distribution des follicules observées chez les femelles miR-202-KO sont cohérentes avec le rôle de miR-202 dans la régulation du recrutement des follicules au milieu et à la fin de la croissance primaire. Grâce au développement de méthodes innovantes, cette étude a ainsi permis de mieux comprendre la dynamique ovarienne chez les poissons, ainsi que la manière dont miR-202 est impliqué dans sa régulation.

Title : Three-dimensional assessment of oogenesis dynamic aspects and its regulation through miR-202 in the medaka *Oryzias latipes*.

Keywords : Oogenesis, dynamics , miRNA, miR-202, 3D microscopy, medaka

Abstract : The ovary is characterized by processes of oocyte growth, storage and recruitment, thus resulting in important cellular rearrangements during the female life cycle. In medaka *Oryzias latipes*, as in other teleost fish, these mechanisms of oogenesis are poorly understood from a quantitative point of view and often remain extrapolated from fractions of the whole organ. As a consequence, knowledge of oocyte population dynamics in the ovary is limited, although this is essential for understanding the regulation of fertility, most notably in species with short spawning intervals such as medaka. To address this, we have developed a method for analyzing whole ovaries that is comprehensive, accessible and also transferable to other species. By combining tissue clearing, 3D confocal microscopy and image analysis assisted by deep learning algorithms, our method allowed the extraction of quantitative and morphological data at different stages of development. The analysis of ovarian content changes over time revealed the establishment of different follicular reserves during female growth/maturation, indicating the presence of two major recruitments that progressively supply asynchronous follicular distribution in the reproducing adult. The study of the miR-202-KO line with reduced fertility has highlighted the importance of maintaining the asynchronous distribution of follicles for the establishment of a normal fertility rate. The deregulations of follicle distribution patterns observed in miR-202-KO females were consistent with a role for miR-202 in regulating follicle recruitment during mid and late primary growth. Through the development of innovative methods, this study provided a new understanding of ovarian dynamics in fish, as well as a better comprehension of how miR-202 is involved in its regulation.