



**HAL**  
open science

# Vers l'identification des cellules souches spermatogoniales chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*): marqueurs, fonctions et voies de régulation

Johanna Bellaïche

► **To cite this version:**

Johanna Bellaïche. Vers l'identification des cellules souches spermatogoniales chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*): marqueurs, fonctions et voies de régulation. Biologie animale. Université de Rennes, 2014. Français. NNT : 2014REN1S096 . tel-01127935

**HAL Id: tel-01127935**

**<https://theses.hal.science/tel-01127935>**

Submitted on 9 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Johanna Bellaïche**

Préparée à l'unité de recherche INRA UR1037, LPGP  
Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons  
U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement

---

**Vers l'identification  
des cellules souches  
spermatogoniales  
chez la truite  
(*Oncorhynchus  
mykiss*) : marqueurs,  
fonctions et voies de  
régulation**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 11 mars 2014**

devant le jury composé de :

**Bertrand PAIN**

Directeur de Recherche  
INSERM U846 SBRI, Lyon / *rapporteur*

**Pascal SOURDAINE**

Professeur des Universités  
CNRS UMR BOREA, Caen / *rapporteur*

**Helena D'COTTA**

Chargée de Recherche  
CIRAD UMR110 Intrépid, Montpellier / *examinatrice*

**Charles PINEAU**

Directeur de Recherche  
INSERM U1085 IRSET, Rennes / *examineur*

**Florence LE GAC**

Directrice de Recherche  
INRA UR1037 LPGP, Rennes / *directrice de thèse*

**Jean-Jacques LAREYRE**

Directeur de Recherche  
INRA UR1037 LPGP, Rennes / *co-directeur de thèse*



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Johanna Bellaïche**

Préparée à l'unité de recherche INRA UR1037, LPGP  
Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons  
U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement

---

**Vers l'identification  
des cellules souches  
spermatogoniales  
chez la truite  
(*Oncorhynchus  
mykiss*) : marqueurs,  
fonctions et voies de  
régulation**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 11 mars 2014**

devant le jury composé de :

**Bertrand PAIN**

Directeur de Recherche  
INSERM U846 SBRI, Lyon / *rapporteur*

**Pascal SOURDAINE**

Professeur des Universités  
CNRS UMR BOREA, Caen / *rapporteur*

**Helena D'COTTA**

Chargée de Recherche  
CIRAD UMR110 Intrépid, Montpellier / *examinatrice*

**Charles PINEAU**

Directeur de Recherche  
INSERM U1085 IRSET, Rennes / *examineur*

**Florence LE GAC**

Directrice de Recherche  
INRA UR1037 LPGP, Rennes / *directrice de thèse*

**Jean-Jacques LAREYRE**

Directeur de Recherche  
INRA UR1037 LPGP, Rennes / *co-directeur de thèse*



---

*« L'esprit cherche mais c'est le cœur qui trouve. »*

George Sand

À ma mère



---

# REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier ma directrice de thèse, Florence Le Gac. Ce fut « trois » années de thèse extrêmement enrichissantes passées en ta compagnie. Merci pour ta confiance et ton implication afin de développer et d'exploiter au mieux les données acquises au cours de ce projet. J'ai aussi fortement apprécié les moments de détente passés ensemble à l'occasion de repas ou de célébrations.

Merci à Jean-Jacques Lareyre, mon co-directeur de thèse. Tes compétences en phylogénie et en biologie moléculaire m'ont (nous ont) été d'une grande aide pour approfondir les résultats. Ton point de vue sur les données nous a permis d'être plus critiques dans nos analyses.

Un très grand merci à Anne-Sophie sans qui de nombreuses expériences n'auraient pas pu aboutir. Ton expertise et ton sens de l'organisation m'ont été d'un grand secours au cours de ces trois années. Je ne pourrais pas compter le nombre de PCR que tu as réalisées dans le projet ! Nos discussions (plus ou moins scientifiques) furent tout aussi d'un grand secours au cours de la thèse.

Les autres membres de l'équipe ne sont pas en reste. Un merci tout particulier à Elisabeth pour son implication dans la partie régulation. Des résultats extrêmement intéressants et originaux ont été obtenus grâce à l'utilisation de ces échantillons. Merci aux thésards qui m'ont accompagné dans l'équipe Physiologie Testiculaire et Puberté, Aude, Vanessa, encore Elisabeth (et à nouveau Félicitations pour l'obtention de ta thèse) et Edouard. Bon courage pour la suite !

Au cours de ce projet de thèse, j'ai eu l'opportunité et la chance de participer à l'encadrement de plusieurs stagiaires, Naoual en master 2 pour son travail de clonage et PCRq, et Léa en IUT pour son travail sur le génotypage. Merci à toutes les deux, j'ai passé de grands moments avec vous (dans et en dehors du labo). Je n'oublie pas non plus Zuzanna (Zuzka !), doctorante de République Tchèque venu trois mois au laboratoire pour apprendre de nouvelles techniques. Tu as aussi fortement contribué à l'avancement du projet et l'obtention de résultats intéressants, merci. On se voit bientôt à Prague !

Merci à Isabelle Allemand, membre de mon comité de thèse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour apprendre l'immunohistochimie et me montrer la technique de FACS. Tes travaux sur le modèle souris nous ont permis de mieux comprendre la thématique générale des SSCs. Merci aux autres membres du comité de thèse, Bertrand Pain, Pascal Sourdain, Jean-Charles Gabillard et Mike Primig (mon tuteur). Les deux comités qui ont eu lieu furent d'un grand secours pour finaliser la démarche expérimentale en première année de thèse, et pour affiner l'interprétation des résultats en dernière année.

Parmi les membres du comité, deux ont accepté d'être aussi rapporteur de mon manuscrit de thèse, Bertrand Pain et Pascal Sourdain, merci à vous deux. Merci aussi à Helena D'Cotta et Charles Pineau d'avoir accepté de faire partie de mon jury.



---

Merci aux nombreuses autres personnes qui ont participé à ce projet notamment pour l'apprentissage de nouvelles techniques ou l'utilisation d'appareils. Parmi ces personnes, je tiens tout particulièrement à remercier Chantal Cauty qui a très activement contribué aux travaux de Micro-Electronique. Ton expertise dans ce domaine m'a impressionnée et à la fois effrayée. Te voilà à nouveau très motivée pour travailler en histologie, c'est très agréable.

Merci à Cécile, Jean-Luc et Lionel qui veillent sept jours sur sept sur les truites.

Un grand merci à tout le personnel du laboratoire pour leur aide (scientifique et administratif) et leur discussion. Pour ne citer que certains, merci à Patricia, Guylène, Céline, Patrick, Nathalie Sabin (pour la technique d'immunocytochimie notamment), Catherine, Alexandra (pour les micro-injections), ...

Un remerciement tout particulier aux membres de l'école doctorale VAS notamment Badia Mssassi pour sa compréhension et son soutien en cette fin de doctorat.

Au cours de ces trois années (presque quatre avec le stage de Master 2), j'ai connu puis perdu de vue de nombreux non-titulaires. De nouvelles personnes sont arrivées chaque année avec à chaque fois de nouvelles amitiés qui se sont formées.

En premier lieu, merci à la fine équipe de mon stage de master 2 (Nadia, Karina, Hicham, Francesco, ...), vous avez contribué à mon attachement au laboratoire et mon désir de rester trois années de plus à Rennes.

Karina et Pascal (et toutes votre bande de parigots), merci pour les bons petits plats, les soirées jeux, les journées shopping. Merci aussi pour votre motivation infaillible pour les balades en forêt et partir à la découverte de la région. A refaire à Lyon !

Fernanda, ta bonne humeur et ta joie de vivre m'ont impressionnée. Toujours motivée pour sortir après le labo pour aller boire un verre, faire du shopping, se balader au Thabor ou venir manger chez nous. Je pense que le fromage, le pain et le vin te manquent au Panama. J'essaierais de t'en rapporter !

Morgane, je crois que j'ai passé avec toi les soirées les plus folles/bizarres/fun, en espérant te revoir un peu plus souvent. Une pensée à Amélie, et Jean-Marie, avec qui j'ai partagé certaines de ces soirées.

Merci aux autres doctorants/post-doc/CDD/stagiaires pour leurs discussions plus ou moins sérieuses à la pause-café, au Calydon et en soirée : Parfait, Vincent et Céline, Yoann et Géraldine, Clémentine, Yannethon, Jeremy et Angélique, Amine, Ananas, Sophie, Ayaka, Elisa, Bastien, Estelle...

Nadia, l'une des plus belles rencontres au laboratoire, merci de ton soutien pendant ces trois années. Les moments de détente passées avec toi et toute ta (notre) bande, Nassim, Cécile (Tac), Aurélie, Nicolas, Thomas et le petit nouveau Naïm sont gravés dans ma mémoire. Je repense notamment aux fameux jours de l'an, aux séjours en Tunisie inoubliables et nos soirées filles délirantes.



---

Un énorme merci aux amis de toujours, Coralie (et Seb) et Eléonore (et Manu). Je me réjouis qu'on ne perde pas contact malgré l'éloignement qui nous empêche de nous voir aussi souvent que l'on voudrait. Je pense aussi aux autres amis de la région parisienne, Vincent et Manue, Guillaume, Charlotte, Olivier et Véro, Elodie et Nicolas, JC...

Enfin, merci à mon frère et mon père (qui je crois, n'a pas encore bien compris ce qu'était une thèse) ainsi que le reste de la famille. Merci à tous pour votre soutien mutuel lors de ma deuxième année de thèse. Une dure épreuve à traverser. Et Samuel, je vais bientôt piquer tes cours et te poser beaucoup de questions. L'avenir est en route.

Au-delà du diplôme et de l'expérience scientifique et humaine acquis au cours de cette thèse, le doctorat m'a permis de rencontrer une personne qui est devenue extrêmement importante pour moi. Aurélien, merci de m'avoir soutenue, supportée, motivée, amusée, détendue,... au cours de ces dernières années. Et merci pour ton aide très précieuse ces derniers jours. Dans deux ans, on inverse les rôles.

MERCI À TOUS



---

# ABREVIATIONS

## Termes généraux

<b>Aal</b>	(spermatogonie) A aligned
<b>Adark</b>	(spermatogonie) A dark
<b>Adiff</b>	(spermatogonie) A differentiated
<b>Aint</b>	(spermatogonie) A intermédiaires
<b>Apale</b>	(spermatogonie) A pale
<b>Apr</b>	(spermatogonie) A paired
<b>As</b>	(spermatogonie) A single
<b>Aund</b>	(spermatogonie) A undifferentiated
<b>BrdU</b>	BromodéoxyUridine
<b>CGP</b>	Cellule Germinale Primordiale
<b>ESC</b>	Embryonic Stem Cell
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell-Sorting
<b>FIV</b>	Fécondation <i>In Vitro</i>
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GS</b>	Germline Stem cell
<b>HPG</b>	HyPoGonadal (mouse)
<b>HSC</b>	Hematopoïetic Stem Cell
<b>IPS</b>	Induced Pluripotent Stem cell
<b>jpc</b>	jour(s) post-coït
<b>jpf</b>	jour(s) post-fécondation
<b>KO</b>	Knock Out
<b>LRC</b>	Label Retaining Cells
<b>MACS</b>	Magnetic Activated Cell Sorting
<b>mGSCs</b>	multipotent Germline Stem Cells
<b>miR</b>	micro ARN
<b>OSC</b>	Ovarian Stem Cell
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RGS</b>	Rapport Gonado-Somatique
<b>RTG2</b>	Rainbow Trout Gonadal cell line-2
<b>SP</b>	Side Population
<b>SSC</b>	Spermatogonial Stem Cell



---

## Noms complets des protéines

<b>11-KT</b>	11-KetoTestosterone
<b>17a20bOHP (= MIS)</b>	17 alpha, 20 beta-dihydroxyprogesterone
<b>Akt (PKB)</b>	Protéine kinase B
<b>ABCG2 (=BCRP1)</b>	ATP-Binding Cassette sub-family G member 2
<b>AMH</b>	Anti-Mullerian Hormone
<b>BCL6B</b>	B Cell CLL/Lymphoma 6, member B
<b>BCRP1 (= ABCG2)</b>	Breakpoint Cluster Region Pseudogene 1
<b>BMP4</b>	Bone Morphogenetic Protein 4
<b>CD90 (= THY1)</b>	Cluster Differentiation 90 (= Thymus cell antigen 1)
<b>CDH1</b>	CaDHerine 1 (= E-Cadherine)
<b>C-KIT</b>	KIT Receptor
<b>CSF1</b>	Colony Stimulating Factor 1
<b>CSF1R</b>	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
<b>CXCL12 (=SDF1)</b>	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12a
<b>CXCR4</b>	C-X-C chemokine receptor type 4
<b>CYP26B1</b>	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1
<b>DAZL</b>	Deleted in azoospermia-like
<b>DMRT1</b>	Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1
<b>E2</b>	17beta-estradiol
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EPCAM</b>	EPithelial Cell Adhesion Molecule
<b>ER</b>	Estrogen Receptor
<b>ETV5 (ou ERM)</b>	ETS Variant 5
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FLT3</b>	Fms-Like Tyrosine kinase 3
<b>FOXL2</b>	Forkhead bOX L2
<b>FSH</b>	Follicle Stimulating Hormone
<b>Fyn</b>	oncogene (related to src and yes)
<b>GDNF</b>	Glial cell line derived neurotrophic factor
<b>GFRA1</b>	GDNF family receptor alpha 1
<b>GPR125</b>	G Protein-Coupled Receptor 125
<b>GSDF</b>	Gonadal Somatic cell Derived Factor
<b>ID4</b>	Inhibitor of DNA binding 4
<b>IGF1</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>IL-1beta</b>	InterLeukine-1beta
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>KITL (=SCF)</b>	KIT Ligand
<b>LH</b>	Luteinizing Hormone
<b>Lhx1</b>	LIM homeobox 1
<b>LIF</b>	Leukemia Inhibitory Factor
<b>Lyn</b>	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog



---

<b>MDR1</b>	Multi-Drug Resistance 1
<b>MIS (= 17a20bOHP)</b>	Maturation Inducing Steroid
<b>MLC2</b>	myosin light chain 2
<b>MVH</b>	Mouse Vasa Homolog
<b>NGN3</b>	Neurogenine 3
<b>N-myc</b>	myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PI3k</b>	PhosphoInositide 3-Kinase
<b>PLZF</b>	Promyelocytic leukaemia zinc-finger
<b>POU5F1 (OCT4)</b>	POU domain, class 5, transcription Factor 1
<b>SALL4</b>	Spalt-like 4
<b>SCA1</b>	Surface cell antigen 1
<b>SCF (= KITL)</b>	Stem Cell Factor
<b>SDF1A (=CXCL12)</b>	Stromal cell-Derived Factor 1a
<b>SDY</b>	sexually dimorphic on the Y chromosome
<b>SOHLH</b>	Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix
<b>SOX9</b>	SRY (sex determining region Y)-bOX 9
<b>Src</b>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase src
<b>SSEA1</b>	Thiosulfate sulfurtransferase
<b>STAT3</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
<b>STRA8</b>	Stimulated by retinoic acid 8
<b>Taf4b</b>	TATA Box Binding Protein associated Factor 4b
<b>TDRD1</b>	TuDoR Domain containing 1
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TNFalpha</b>	Tumor Necrosis Factor alpha
<b>UPD</b>	citokine-like Unpaired
<b>Yes</b>	Yamaguchi sarcoma viral oncogene



---

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. La truite arc-en-ciel, un modèle de choix pour les études du système reproducteur .....</b>	<b>2</b>
1.1. <i>Une espèce d'intérêt agronomique.....</i>	2
1.2. <i>La Truite, un vertébré, actinoptérygien, téléostéen, salmonidé !.....</i>	3
1.2.1. <i>500 millions d'années d'évolution.....</i>	3
1.2.2. <i>Quatre évènements de duplication du génome.....</i>	4
1.3. <i>De l'œuf à l'animal mature, un développement lent mais conséquent .....</i>	4
1.3.1. <i>Un cycle de vie long .....</i>	4
1.3.2. <i>Un animal imposant .....</i>	5
1.4. <i>Mâle ou femelle ? Un déterminisme génétique du sexe.....</i>	6
1.4.1. <i>Un gène déterminant majeur du sexe, sdy, porté par l'hétérochromosome Y.....</i>	6
1.4.2. <i>Différenciation sexuelle mise en place après l'éclosion .....</i>	6
1.5. <i>Une reproduction saisonnée au sein de cystes germinaux synchrones.....</i>	7
1.5.1. <i>Proliférations clonales des cellules germinales au sein du cyste .....</i>	7
1.5.2. <i>Un contrôle local et périphérique du cycle spermatogénétique .....</i>	9
<b>2. Les cellules souches germinales, à la source de la reproduction.....</b>	<b>11</b>
2.1. <i>Les cellules souches, seules cellules à pouvoir s'auto-renouveler et se différencier en cellules spécialisées.....</i>	11
2.1.1. <i>Premières découvertes.....</i>	11
2.1.2. <i>Au sein d'une niche .....</i>	12
2.1.3. <i>Différentes hypothèses de division .....</i>	12
2.2. <i>Les cellules germinales souches embryonnaires, constitution du pool initial de cellules germinales.....</i>	13
2.2.1. <i>Origine de la lignée germinale.....</i>	13
2.2.2. <i>CGPs, migration des futures cellules germinales.....</i>	14
2.2.3. <i>Gonocytes, formation de la gonade définitive.....</i>	15
2.3. <i>Les cellules germinales souches adultes, support de l'apport continu en gamètes matures .....</i>	16
2.3.1. <i>Des ovogonies souches adultes ? .....</i>	16
2.3.2. <i>Les cellules spermatogoniales souches.....</i>	17
2.3.3. <i>Plasticité phénotypique des cellules germinales souches .....</i>	18
<b>3. Identité des cellules spermatogoniales souches (SSCs) .....</b>	<b>20</b>
3.1. <i>Une sous-population au sein des spermatogonies .....</i>	20
3.1.1. <i>La zone germinative de la gonade régionalisée.....</i>	20
3.1.2. <i>Modèle de Clermont ou d'Huckins chez les rongeurs, deux théories sur l'identité des SSCs .....</i>	22
3.1.3. <i>Apale ou Adark chez les primates ?.....</i>	23
3.1.4. <i>Dans la gonade cystique des poissons téléostéens, des spermatogonies A isolées.....</i>	24
3.2. <i>Des caractéristiques fonctionnelles liées à leurs propriétés de cellules souches .....</i>	25
3.2.1. <i>Transplantation, test pour la colonisation de la niche, l'auto-renouvellement et la différenciation des SSCs ..</i>	26
3.2.2. <i>Phénotype « Side population », efflux du hoechst 33342.....</i>	28
3.2.3. <i>« Label Retaining Cells », reflet de la faible prolifération des SSCs in vivo .....</i>	28
3.2.4. <i>Clonogénicité in vitro, reflet de l'auto-renouvellement des SSCs .....</i>	30
3.2.5. <i>Une activité alcaline phosphatase.....</i>	30
3.3. <i>Des gènes spécifiquement exprimés .....</i>	30
3.3.1. <i>Des protéines membranaires, un outil de tri des SSCs.....</i>	31
3.3.2. <i>Des facteurs de transcription, un outil d'identification in situ des SSCs.....</i>	35
<b>4. Régulation du devenir des cellules spermatogoniales souches.....</b>	<b>40</b>



<b>4.1. Facteurs endogènes au SSCs</b> .....	40
4.1.1. Marqueurs de SSCs et acteurs dans leurs régulations.....	40
4.1.2. Piwi et les petits ARNs, gardiens des SSCs.....	40
<b>4.2. Des facteurs paracrines sécrétés par les cellules somatiques de la niche</b> .....	43
4.2.1. <i>Gdnf</i> , important stimulateur de l'auto-renouvellement des SSCs.....	43
4.2.2. D'autres facteurs stimulateurs de l'auto-renouvellement des SSCs.....	44
4.2.3. Le Stem Cell Factor (SCF ou kit ligand), un rôle à l'opposé de son appellation.....	46
4.2.4. Chez les téléostéens, IGF1 et AMH, des stimulateurs de la prolifération des spermatogonies A ou des SSCs ?47	
<b>4.3. Les hormones, messagers de l'organisme</b> .....	48
4.3.1. La <i>Fsh</i> , régulateur positif de l'autorenouvellement des SSCs.....	48
4.3.2. Les stéroïdes sexuels.....	49
4.3.3. L'acide rétinoïque, engagement dans la voie de différenciation.....	50
<b>PROJET DE THESE</b> .....	<b>51</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>56</b>
<b>Volet 1 - Identification de la population de cellules spermatogoniales souches au sein des cellules germinales testiculaires</b> .....	<b>56</b>
I - "Spermatogonial stem cell quest: <i>nanos2</i> , marker of a sub-population of undifferentiated A spermatogonia in trout testis" – Article 1.....	57
II - Résultats complémentaires.....	88
A. Des descendants positifs issus d'individus transplantés en deuxième cycle de spermatogenèse.....	88
B. La famille <i>nanos</i> , une histoire évolutive complexe.....	93
III – Conclusions du volet 1.....	99
<b>Volet 2 - Régulation du devenir des cellules spermatogoniales souches de truite</b> .....	<b>101</b>
I - <i>gdnf-gfra1</i> pathway is expressed in a spermatogenetic dependent manner and is regulated by FSH in a fish testis. – Article 2.....	102
II – Résultats complémentaires.....	126
Implication de la voie <i>ckit-kit</i> ligand au sein du testicule de truite.....	126
III – Conclusions du volet 2.....	132
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>134</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>156</b>
<b>Annexe 1 - Valorisation des résultats</b> .....	<b>186</b>
<b>Annexe 2 - Mini-poster présenté au 17th European Testis Workshop</b> .....	<b>187</b>
<b>Annexe 3 - Poster présenté à la GRC : Germinal Stem Cell Biology</b> .....	<b>188</b>
<b>Annexe 4 - Abstract de la communication orale au 46th Annual Meeting de la SSR</b> .....	<b>189</b>



---

# INTRODUCTION



---

Afin de bien comprendre le contexte biologique dans lequel s'inscrit mon sujet de thèse « Vers l'identification des cellules souches spermatogoniales chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) : marqueurs, fonctions et voies de régulation », quatre points principaux vont être développés en introduction. Dans un premier chapitre, les caractéristiques biologiques générales puis plus particulièrement des gonades de notre espèce modèle, la truite arc-en-ciel, vont être détaillées. Les trois chapitres suivants traiteront ensuite des cellules spermatogoniales souches en comparant les données connues chez plusieurs espèces modèles, notamment la drosophile, le groupe des chondrichthyens, les téléostéens (incluant la truite), et les mammifères (surtout rongeurs et primates). Le deuxième chapitre retracera l'histoire du concept des cellules souches ainsi que les différents types de cellules souches germinales des gonades. Dans le troisième chapitre, les éléments caractéristiques des cellules spermatogoniales souches seront exposés, pour finir sur un dernier chapitre décrivant les mécanismes de régulations impliqués dans leur devenir, auto-renouvellement versus différenciation. Au cours de mon exposé, j'utiliserai le terme anglais SSCs = Spermatogonial Stem Cells pour nommer les spermatogonies souches, afin d'être en cohérence avec la très vaste majorité de la bibliographie en langue anglaise sur ce sujet.

## **1. La truite arc-en-ciel, un modèle de choix pour les études du système reproducteur**

### **1.1. Une espèce d'intérêt agronomique**

La truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, représente la première production piscicole en France. Au niveau mondial, 770 000 tonnes de poissons ont été produits en 2011 (données FAO « Food and Agricultural Organization »). Pourtant, plusieurs freins à l'essor de sa production persistent tels que l'entrée en maturité sexuelle précoce qui est antagoniste à la qualité de production pour les poissons destinés à la consommation. Plus précisément, il existe une relation négative entre la maturation sexuelle et les performances de croissance et de qualité de la chair des poissons. Les conséquences de cette relation négative sont aggravées par les conditions d'élevage qui favorisent les taux de maturation précoce surtout chez les mâles. Cela a pour conséquence de limiter le nombre de poissons qui atteignent la taille commerciale optimale en salmoniculture et un surcoût important pour la profession. Par ailleurs, la stérilisation des poissons en grossissement devient un enjeu majeur pour limiter l'impact négatif de la reproduction sur la production mais aussi pour réduire ou éliminer les risques liés aux



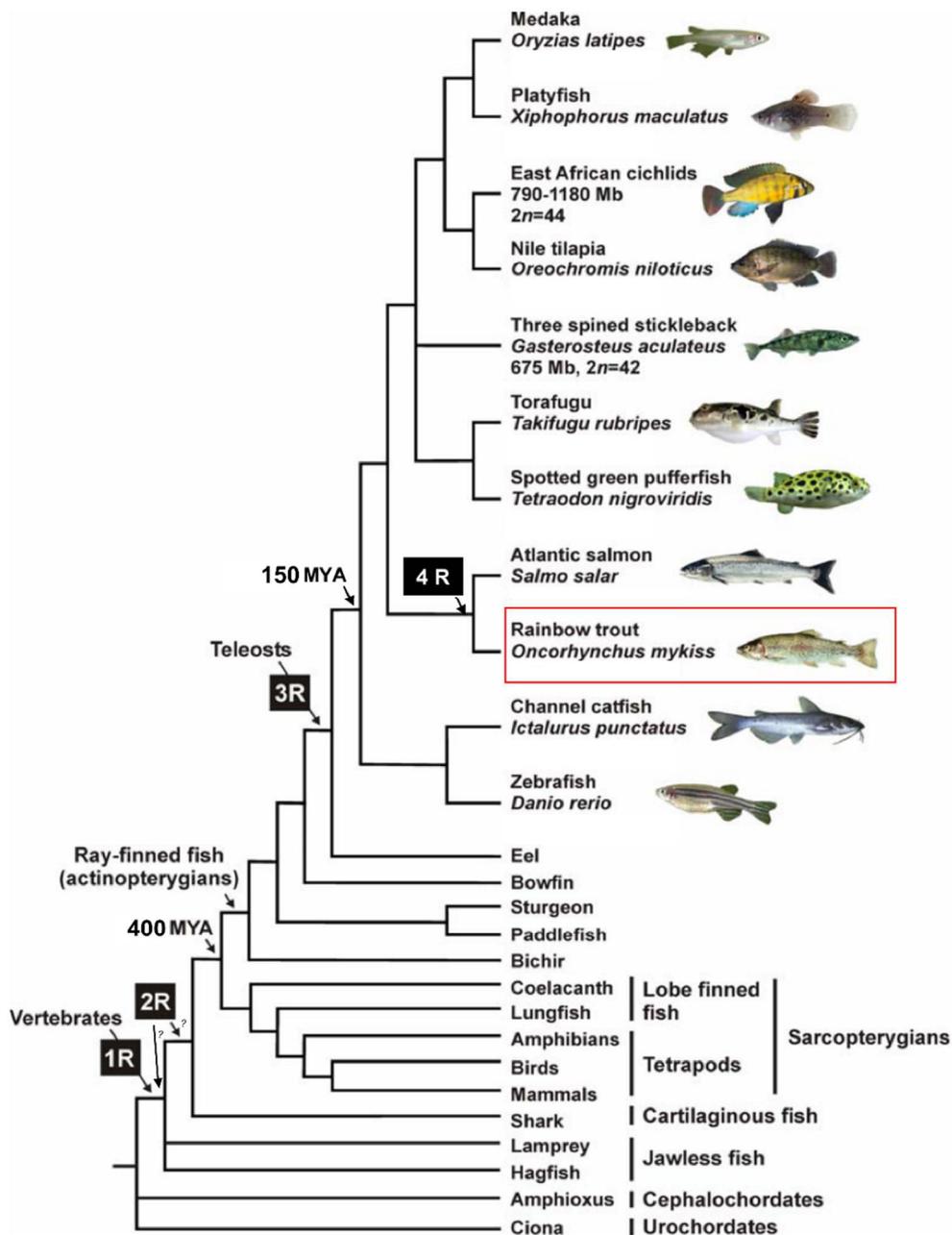
---

échappements de souches génétiquement sélectionnées (ou allochtones) sur le maintien de la biodiversité dans l'environnement naturel des fermes piscicoles (compétition pour le biotope, introgression de gènes). Il existe des approches pour réduire partiellement les risques tels que le monosexage ou la triploïdie. Ces méthodes sont considérées comme non durables et rejetées par certains consommateurs et éleveurs (*e.g.* cas du saumon en Norvège). La maîtrise du cycle de reproduction est donc un enjeu important pour la compétitivité des installations piscicoles. Cependant, les possibilités d'innover restent limitées du fait du manque de connaissances des mécanismes de régulation mis en jeu. En effet, nos connaissances des acteurs moléculaires intra-gonadiques impliqués dans le déclenchement de la gamétogenèse et la régulation de leur expression spatio-temporelle sont très partielles et même rares chez les poissons téléostéens.

## **1.2. La Truite, un vertébré, actinoptérygien, téléostéen, salmonidé !**

### *1.2.1. 500 millions d'années d'évolution*

L'embranchement des vertébrés est représenté par plus de 65 000 espèces, avec plus de la moitié de « poissons » (Volf, 2005). Ce terme « poisson » désigne communément les vertébrés aquatiques à branchies et nageoires, et constitue un groupe paraphylétique composé des cyclostomes (lamproies et myxines), des chondrichthyens ou poissons cartilagineux (raies et requins), des actinoptérygiens ou poissons osseux à nageoires « rayonnées » (la majorité des poissons) ainsi que quelques espèces de sarcoptérygiens, les poissons osseux à nageoires « charnues » (cœlacanthes et dipneustes). Ce dernier groupe s'avère évolutivement plus proches des tétrapodes (amphibiens, mammifères,...). L'évolution des vertébrés est liée à l'évolution des génomes en raison des événements de duplications complètes auxquelles on attribue le fait que l'apparition de gènes surnuméraires aurait favorisé la colonisation des milieux et la divergence des espèces ancestrales (Cloutier, 2010; Meyer and Schartl, 1999; Meyer and Van de Peer, 2005). Deux événements de duplication totale du génome sont proposés chez les tout premiers vertébrés. La position exacte de ces événements est encore incertaine puisque plusieurs arguments s'opposent pour déterminer si les cyclostomes ont bien subi ces deux duplications. L'apparition des gnathostomes remonte au moins à -430 millions d'années, âge du plus ancien fossile découvert. Au sein de ce groupe, on distingue les chondrichthyens (poissons cartilagineux), des ostéichtyens (squelette minéralisé) dont le plus ancien fossile remonte à -420 millions d'années. Ce taxon s'est divisé en deux grands groupes, les actinoptérygiens (poissons osseux à nageoires lobées) et les sarcoptérygiens (membres charnus) vers -400 millions d'années. Ce dernier groupe comprend les tétrapodes (environ 30 000



**Figure 1 : Arbre phylogénétique retraçant l'évolution des génomes des vertébrés.**

Deux évènements de duplication du génome ont eu lieu à la base de l'embranchement des vertébrés (1R-2R). Les sarcoptérygiens (groupe qui inclut les mammifères) et les actinoptérygiens (groupe qui inclut la majorité des espèces de « poissons ») se sont séparés il y a environ 400 millions d'années. Une nouvelle duplication du génome, la 3R, a eu lieu chez les téléostéens (dont fait partie la truite). Le génome des salmonidés a subi à nouveau un évènement de duplication complet de son génome, la 4R. Adapté de (Froschauer et al., 2006).

---

espèces), composé des amphibiens, mammifères, reptiles aviaires et non aviaires. L'arbre phylogénétique retraçant l'évolution des vertébrés est présenté en Figure 1.

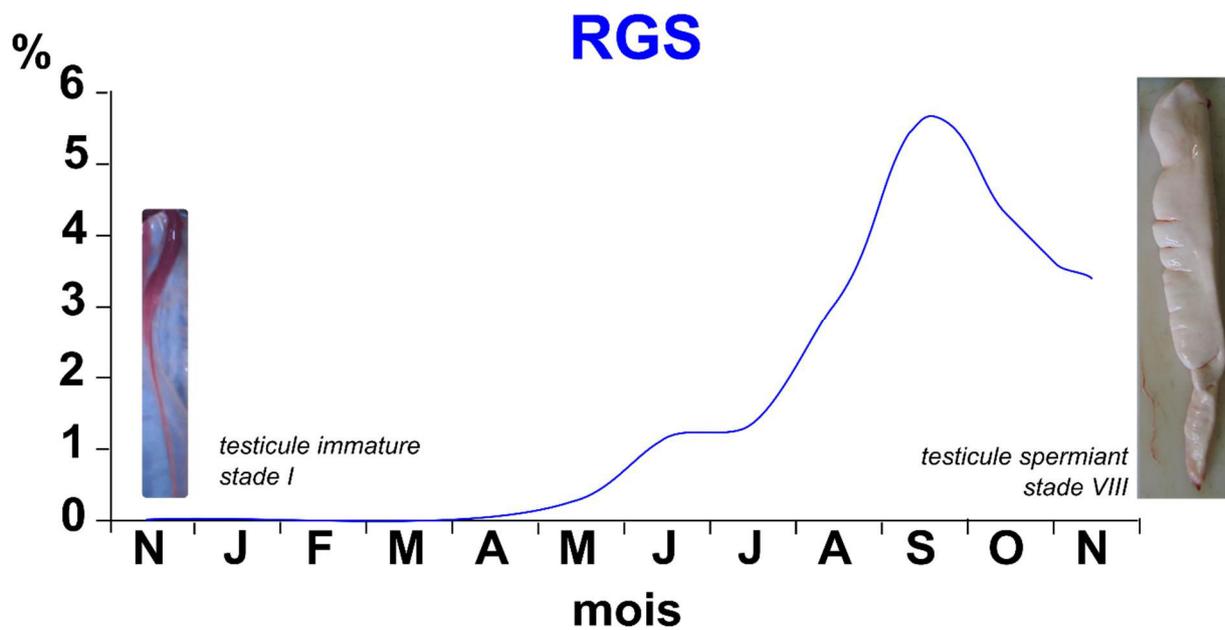
### *1.2.2. Quatre évènements de duplication du génome*

La truite est incluse dans le groupe des téléostéens, le plus gros groupe au sein des actinoptérygiens comptant 28 000 espèces actuelles (source Catalog of life), groupe qui a subi une troisième duplication complète du génome (3R) (Ohno et al., 1968). Enfin, plus précisément, au sein des téléostéens, la truite appartient à la famille des salmonidés comprenant aussi d'autres poissons d'intérêts agronomiques tels que les saumons et les ombles. Des travaux ont permis de montrer que cette famille a subi une quatrième duplication de leur génome (4R) (Allendorf and Utter, 1976). Ces résultats sont maintenant étayés par les séquençages du génome de saumon et de la truite (projet GENOTROUT français, USDA NRSP Program, CGRASP). En effet, un gène donné chez la souris (*Mus musculus*) par exemple, peut avoir jusqu'à quatre paralogues « fonctionnels » chez la truite. Par ailleurs, il est intéressant de comparer les temps d'évolutions séparant deux espèces modèles en biologie appartenant aux mammifères, homme et souris, et appartenant aux téléostéens, poisson-zèbre (*Danio rerio*) et truite arc-en-ciel. L'homme (*Homo sapiens*) et la souris ont divergé il y a environ 100 millions d'années tandis que le poisson-zèbre et la truite ont divergé il y a 150 millions d'années. Par comparaison, presque 400 millions d'années séparent la truite et la souris. Cette distance évolutive associée à la 4R des salmonidés (2R pour les mammifères) suggère une forte divergence entre la biologie de ces deux groupes. Pourtant, des fonctions biologiques (comme la spermatogenèse), des régulations physiologiques (contrôle neuroendocrinien de la reproduction), et des expressions de gènes (*vasa* dans les cellules germinales) sont conservés au cours de l'évolution des vertébrés, voire même au cours de l'évolution des métazoaires comme chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), une autre espèce modèle en biologie.

## **1.3. De l'œuf à l'animal mature, un développement lent mais conséquent**

### *1.3.1. Un cycle de vie long*

La truite arc-en-ciel est un poisson carnivore originaire du continent nord-américain. Elle a été introduite dans de nombreux pays à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, notamment en France en 1874. Ses températures optimales de vie s'étalent de 7 à 17°C quand des températures supérieures à 22-25°C deviennent létales. La truite arc-en-ciel est décrite comme étant anadrome non obligatoire c'est-à-dire qu'elle suit un cycle de migration d'eau salée à eau douce. Le cycle de



**Figure 2 : Rapport gonado-somatique du testicule de truite en fonction de la saison**

Le Rapport Gonado-Somatique (RGS) reflète l'état d'avancement du cycle spermatogénétique. L'évolution de son taux en fonction de la saison est représenté ici pour une truite de souche « automnale ». Ce RGS est inférieur à 0,05%, et reste constant pendant la croissance chez l'individu immature (ici jusqu'en mars). Le testicule spermiant, en fin de cycle spermatogénétique, représente environ 5% du poids du corps de l'animal.

---

reproduction des animaux matures dure une année, au cours de laquelle les gonades vont se développer pour produire, de façon synchrone, des gamètes et régresser après l'émission de ceux-ci. À la période de frai, les truites adultes présentent un dimorphisme sexuel externe caractéristique avec, entre autres, la présence d'une excroissance de la mâchoire inférieure appelée bécard, et une couleur du corps gris/vert avec une bande latérale orangée chez le mâle. En conditions sauvages, une femelle va pondre une grande quantité d'œufs (environ 3000 œufs) et les déposer au sein d'une frayère sur les graviers. Ces œufs seront ensuite rapidement fécondés par le mâle qui les recouvre de sa semence. Dans nos conditions d'élevage, les œufs et le sperme sont manuellement récoltés par pression abdominale. Les œufs fécondés sont ensuite élevés en eau douce stricte à 10-11°C. L'embryon éclot environ 30 jours après la fécondation (300 degrés/jours soit 30 jours post fécondation -jpf- à 10-11°C), puis continue son développement en puisant dans ses réserves vitellines jusqu'à environ 55 jpf où il va commencer à s'alimenter. Par comparaison, l'œuf de poisson-zèbre est transparent, éclot autour de 48h après sa fécondation et est sexuellement mature à 3 mois. Ces caractéristiques ont favorisé son développement comme animal modèle en laboratoire et permettent l'utilisation de techniques de manipulations génétiques efficaces et rapides (morpholinos, lignées transgéniques).

### *1.3.2. Un animal imposant*

Pour autant, la grande taille de la truite apparaît comme un avantage en termes d'accès au matériel biologique en quantité ; œufs de 4 mm, alevin après éclosion de 1,5 cm, truitelle immature de 6 mois de 6 à 9 cm, pour une taille de 30-35 cm de long chez l'animal pré-pubère. Au niveau du testicule, on estime le RGS (Rapport Gonado-Somatique) qui représente le poids de la gonade sur le poids total du corps, et reflète l'état d'avancement du cycle spermatogénétique (détaillé dans la partie 1.5). Ce RGS est inférieur à 0,05%, et reste constant chez l'individu immature. La truitelle de 6 mois a un poids inférieur à 10 g, tandis que l'individu pré-pubère (1 an) pèse autour de 200 g. Après l'entrée en puberté, le RGS va continuellement augmenter au cours du cycle spermatogénétique pour atteindre environ 5% chez l'individu spermiant (mâle en période de frai), correspondant environ à un poids de gonade de 75 g pour 1,5 kg du poids total de l'animal (Figure 2). Cela correspond à un accroissement de la gonade d'un facteur de 1500 par rapport à la gonade juvénile. Ce facteur est à mettre en parallèle avec le nombre important de gamètes matures qui va être produit lors de la période de spermiation. De même, un nombre important d'œufs est produit par la femelle, du fait du faible taux d'animaux qui atteindra l'âge adulte. Dans le cadre de la recherche, la taille des gonades, la cyclicité du développement et la synchronisation de leur maturation sont avantageux en termes



---

d'études de la biologie des téléostéens, notamment au niveau des études menées sur le développement de la gonade.

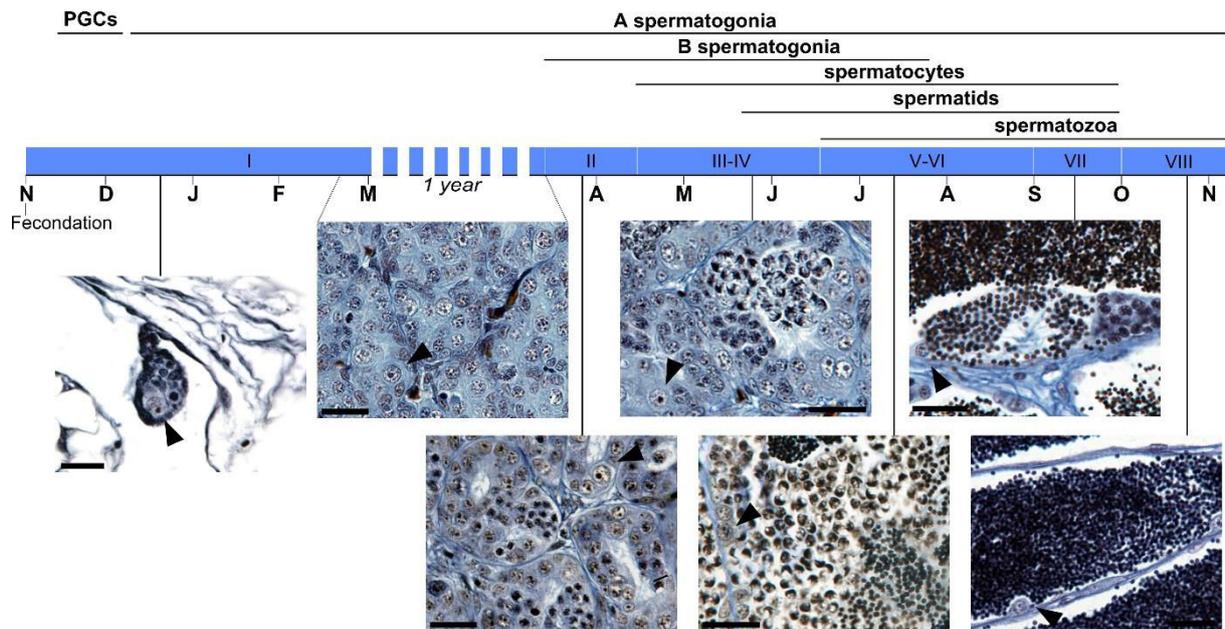
#### **1.4. Mâle ou femelle ? Un déterminisme génétique du sexe**

##### *1.4.1. Un gène déterminant majeur du sexe, *sdv*, porté par l'hétérochromosome Y*

Contrairement à la majorité des mammifères, les poissons téléostéens présentent une grande diversité dans le déterminisme du sexe (Devlin and Nagahama, 2002). Le sexe des poissons peut en effet être déterminé par des facteurs génétiques, mais aussi des facteurs environnementaux tels que la température, le pH, ou encore des facteurs sociaux (Baroiller et al., 2009). De plus, il existe de nombreuses espèces de poissons avec un hermaphrodisme synchrone (ovotestis) ou qui subissent des événements d'inversion sexuelle (fonctionnelle ou non) au cours de leur cycle de vie. On note dans ces cas particuliers, le poisson-zèbre, avec un ovaire immature présent chez tous les juvéniles qui se transforme tardivement en testicule mature fonctionnel pour la population mâle (protérogynie non fonctionnel). Chez la truite, l'existence d'un déterminisme du sexe de type hétérogamétie mâle XY a pu être mise en évidence par l'étude du sex-ratio de la progéniture issue d'individus traités aux stéroïdes (Johnstone et al., 1978), ainsi que par l'observation d'un léger hétéromorphisme dans la taille d'une paire de chromosomes chez le mâle et non chez la femelle (Thorgaard, 1977). Récemment, le gène déterminant majeur du sexe chez les salmonidés, *sdv*, présent sur le chromosome Y a été découvert (Yano et al., 2012). La truite est donc considérée comme un poisson gonochorique strict avec un déterminisme sexuel génétique à hétérogamétie mâle.

##### *1.4.2. Différenciation sexuelle mise en place après l'éclosion*

À la différence du déterminisme du sexe, il y a une plus grande conservation des processus de différenciation sexuelle et de développement des gonades chez les vertébrés, notamment du point de vue moléculaire. Ainsi, on retrouve souvent les mêmes acteurs impliqués spécifiquement dans les voies de signalisation mâle et femelle (SOX9, DMRT1, AMH chez le mâle et FOXL2 chez la femelle) (Siegfried, 2010). Les stéroïdes jouent aussi un rôle prépondérant dans ce processus. Dès les années 1970, des populations de truites, soit strictement mâles, soit strictement femelles, ont été obtenues grâce à des traitements aux stéroïdes sexuels (androgènes et œstrogènes respectivement) sur les géniteurs pendant la période de différenciation sexuelle (entre 30 et 50 jpf) (Johnstone et al., 1978). Ce phénomène est un atout évident pour contrôler et connaître le sexe d'une population car les truites juvéniles ne



**Figure 3 : Le cycle spermatogénétique chez la truite arc-en-ciel**

Chez la truite-arc-en-ciel, la spermatogénèse est saisonnée et à lieu dans tout le testicule au sein de cystes partiellement synchrones. A partir de la spermatogonie A initiale contenue dans un cyste, il va y avoir six cycles de prolifération synchrones conduisant à la formation de 64 spermatogonies B différenciées. Ces cellules se différencient ensuite en spermatocytes primaires, qui vont subir deux méioses successives pour former les spermatides haploïdes. Ces dernières subissent la spermiogénèse aboutissant à la formation des spermatozoïdes matures. En fin de cycle spermatogénétique, les cystes éclatent, les spermatozoïdes sont stockés dans la lumière des tubules avant d'être émis pendant la période de spermiation. Le testicule spermiant, stade VIII, ne contient alors que des spermatozoïdes et quelques spermatogonies A résiduelles sur le bord des tubes séminifères. *Issu de (Bellaïche et al - soumis).*

---

présentent pas de dimorphisme sexuel, morphologique ou lié au poids. Dans notre cas, l'étude de la reproduction chez le mâle, il est nécessaire de différencier rapidement et facilement les deux sexes. Pour cela, nous avons utilisé des populations dites monosexu mâle (100% de descendants mâles) issues du croisement entre une femelle de type sauvage XX et d'un mâle fertile homogamétique YY. Ce dernier étant obtenu à partir d'une fécondation entre un mâle de type sauvage XY et une néo-femelle XY elle-même issue d'un traitement précoce aux œstrogènes (Chevassus et al., 1988). Connaître le sexe gamétique des individus est un avantage certain pour l'étude des gonades chez le juvénile notamment. Le développement de la gonade démarre juste avant l'éclosion (28-30 jpf). C'est à cette période que les cellules germinales primordiales (CGPs) vont coloniser la crête génitale et proliférer au sein d'un tissu de soutien composé de cellules somatiques (Yoshizaki et al., 2000). Durant les premières étapes de développement des gonades, celles-ci sont histologiquement indifférenciées. Les CGPs sont considérées encore comme bipotentes puisque les traitements stéroïdiens autour de 40 jpf permettent une transformation totale de la gonade vers l'autre sexe. Un autre argument renforçant cette idée est que des CGPs issues de truites mâles et transplantées dans un embryon femelle vont se différencier en ovogonies (Okutsu et al., 2006). Ce n'est qu'autour de la 1<sup>ère</sup> alimentation (55 à 60 jpf) que les premières méioses femelles sont observées et permettent de différencier les ovaires des testicules au niveau histologique, tandis que chez le mâle, les premières méioses n'ont lieu qu'après l'initiation de la puberté (Lebrun et al., 1982). En général, celles-ci sont détectées vers 13-15 mois (mature à 2 ans) mais parfois sont observables dès 90-120 jpf en cas de maturation précoce.

## **1.5. Une reproduction saisonnée au sein de cystes germinaux synchrones**

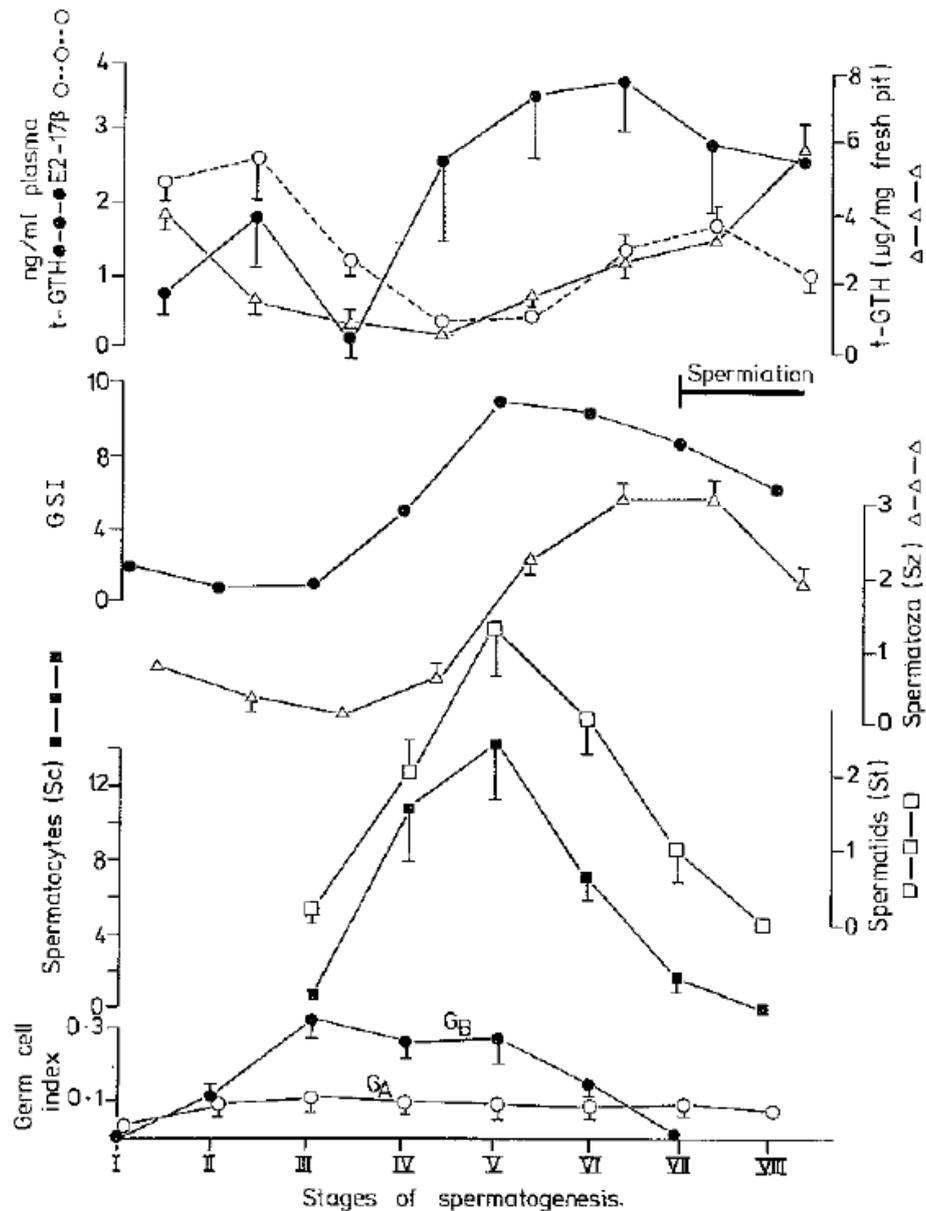
### *1.5.1. Proliférations clonales des cellules germinales au sein du cyste*

La croissance de la gonade chez l'individu mâle immature va être liée à la croissance du corps et consiste en la formation d'un nombre croissant de spermatogonies A (futurs cystes) au sein des tubules séminifères (Figure 3). L'unité en cyste est la cellule germinale initiale ou les cellules germinales filles totalement entourées par une ou plusieurs cellules de Sertoli. Cette organisation en cystes est uniquement observée chez les vertébrés anamniotes (poissons et amphibiens). Cependant, les processus de prolifération et différenciation des cellules germinales au cours de la spermatogenèse sont conservés au sein des vertébrés. A la puberté, les spermatogonies A vont rentrer en prolifération rapide au sein des cystes pour produire les premières spermatogonies B différenciées. Chez la truite, six cycles de prolifération aboutissent



---

à la formation de cystes contenant jusqu'à 64 cellules. Elles vont ensuite initier la méiose pour former 64 spermatocytes primaires diploïdes. Ces derniers vont subir deux méioses successives aboutissant à la formation des spermatides haploïdes. Par le processus de spermiogenèse, les spermatides vont évoluer en spermatozoïdes matures. Le cyste va se rompre et les gamètes vont être expulsés dans la lumière des tubes séminifères. Le sperme est ensuite stocké dans les tubes avant d'être émis au cours de la période de spermiation grâce à un processus d'hydratation du sperme. La truite a une reproduction saisonnée. Au sein d'un cyste, les cellules germinales sont clonales et parfaitement synchrones, et au sein des testicules, les cystes présentent un développement annuel partiellement synchrone. Grâce à la proportion des différents types germinaux au sein du testicule et le RGS, on fait la distinction entre les différents stades de la spermatogenèse, avec le stade I, le testicule immature, ou le stade VIII, le stade spermiant (Gomez et al., 1999). Cette reproduction saisonnée est très dépendante de la photopériode, mais est aussi sensible aux variations saisonnières de la température de l'eau (Jalabert and Fostier, 2010). Grâce à l'utilisation combinée de souches génétiques à reproduction différée et d'un contrôle photopériodique de la saison de reproduction, nous avons accès à des animaux à divers stades de développement à une période donnée. Par exemple, des études peuvent être conduites sur des embryons à plusieurs périodes de l'année, et non limitées à la période de frai de novembre à janvier pour les souches automnales. Outre les cellules germinales et de Sertoli, on retrouve aussi au sein du testicule de truite des cellules myoïdes périvitubulaires, et, dans l'interstitium, les cellules de Leydig et des vaisseaux sanguins. Le testicule de truite est dit de type « non restreint » ce qui correspond à une spermatogenèse se développant à partir de spermatogonies dispersées tout le long des tubules. Cet aspect « non-restreint » se retrouve par exemple chez le poisson-zèbre mais aussi chez les mammifères. Pour autant, certains téléostéens présentent un autre type d'organisation du testicule avec une spermatogenèse « polarisée » avec une zone germinative en extrémité (où se situent les spermatogonies souches). Cette organisation est plus analogue au testicule décrit chez les chondrichthyens mais aussi chez des animaux beaucoup plus distants tel que le germarium de la drosophile. Enfin, il est intéressant de remarquer que la truite ne possède pas de glandes annexes et que les spermatozoïdes émis dans les tubes séminifères transitent dans les canaux efférents et le spermiducte où ils poursuivent leur maturation. La fécondation est externe et ne fait pas intervenir de réaction acrosomiale (absence d'acrosome chez les téléostéens), le spermatozoïde empruntant un conduit qui traverse les enveloppes de l'œuf (mycropyle). L'acquisition de la fécondance et le déclenchement de la motilité des spermatozoïdes se fait lors de leur libération dans l'eau du fait d'une brutale dilution du fluide séminal et des changements de pression



**Figure 4 : Profil hormonal et proportion des cellules germinales dans le testicule au cours du cycle spermatogénétique.**

Le taux plasmatique des hormones stéroïdiennes et gonadotropes évolue au cours du cycle en relation avec la proportion de cellules germinales différenciées et leurs rôles dans la spermatogenèse. La Fsh (GTH) présente un léger pic d'expression en début de cycle spermatogénétique puis un second plus marqué juste avant la fin du cycle (stade VI-VII). Issu de (Billard and Breton, 1978).

---

osmotique (Webb and Miller, 2013).

### 1.5.2. *Un contrôle local et périphérique du cycle spermatogénétique*

Enfin, les différentes étapes de la spermatogenèse sont finement régulées au niveau local par le dialogue entre les cellules somatiques et germinales, et au niveau périphérique via les hormones gonadotropes (Figure 4). Les supports moléculaires de ce dialogue permanent sont des molécules de surface cellulaire, des constituants de la matrice extracellulaire, des facteurs endocrines et paracrines. Les rôles de Lh et Fsh chez les téléostéens semblent moins spécifiques que ce qui est connu chez les mammifères c'est-à-dire, LH régulant la production des stéroïdes sexuels par les cellules de Leydig, FSH régulant l'activité des cellules de Sertoli (Huhtaniemi et al., 2006; Kumar, 2005). En effet, plusieurs études chez la truite, mais aussi chez d'autres espèces de téléostéens, ont montré que Lh mais aussi Fsh peuvent stimuler la production des stéroïdes, et que Fsh pourrait se fixer sur les récepteurs à Lh (Levavi-Sivan et al., 2010). C'est grâce à l'observation de leurs concentrations plasmatiques et des études menées *in vitro* que les rôles de ces deux hormones sur la spermatogenèse ont été partiellement précisés. Lh est détectable dans le plasma de l'individu immature et montre une forte élévation pendant la période de production des spermatozoïdes et de la spermiation. Fsh montre une élévation transitoire au moment des proliférations spermatogoniales actives (stades II-III), puis est très fortement détectée en fin de cycle, juste avant la spermiation (Gomez et al., 1999). Il est proposé que ces deux hormones agissent sur la spermatogenèse en régulant l'expression des stéroïdes sexuels aux divers stades du cycle ; prolifération des spermatogonies en début de cycle et stimulation de la spermiation en fin de cycle pour Fsh, contrôle de la spermiogenèse pour Lh. Les œstrogènes sont détectés en début de spermatogenèse chez la truite. Chez d'autres espèces de poissons tels que le médaka (*Oryzias latipes*) (Song and Gutzeit, 2003) ou le huchon japonais (*Hucho perryi*) (Amer et al., 2001), l'administration d'E2 (17 beta-estradiol) a stimulé la prolifération des spermatogonies *in vitro*. Cette fonction des œstrogènes est aussi connue chez d'autres vertébrés tels que les amphibiens (Minucci et al., 1997) et les reptiles (Chieffi et al., 2002). La 11 Keto-Testosterone (11KT), un androgène spécifique des téléostéens, serait quant à elle plutôt impliquée dans les processus plus tardifs de la spermatogenèse, de la prolifération rapide des spermatogonies aux méioses (Nagahama et al., 1994). Ce rôle est proposé en raison du profil d'expression de cette hormone au cours du cycle spermatogénétique de la truite (Rolland et al., 2013) et d'expériences *in vitro* qui ont permis de voir l'apparition de méioses après ajout de 11KT en culture d'explants chez le huchon japonais (Amer et al., 2001), le poisson-rouge (*Carassius auratus*) (KOBAYASHI et al., 1991) et l'anguille du japon (*Anguilla*



---

*japonica*) (Miura et al., 1991). Enfin, un troisième stéroïde, la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -dihydroxyprogestérone (17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP ou MIS) semble fortement impliquée dans le contrôle de la spermiation et pourrait aussi réguler la méiose (Chen et al., 2010). Une étude chez la truite (Bellaïche et al, non publié) a permis de montrer une corrélation entre les gènes impliqués dans les processus de spermiation et le taux plasmatique de cette hormone. Des résultats obtenus chez l'anguille (Miura et al., 2006) semblent confirmer l'implication du MIS sur la régulation de la spermiation.

La spermatogenèse, fortement dépendante de la saison, et qui progresse de façon partiellement synchrone au cours de l'année, permet d'avoir accès à des stades particuliers du cycle spermatogénétique et d'en étudier les régulations propres au niveau local et périphérique. On peut ainsi, dans le cadre de notre étude, avoir accès aux étapes précoces de la prolifération spermatogoniale (stades I et II) ainsi qu'aux différentes étapes de différenciation des spermatogonies (stades II-IV). De plus, un stade s'avère aussi particulièrement intéressant pour l'étude des cellules souches spermatogoniales chez la truite : le stade spermiant. Le testicule spermiant ne contient plus que des spermatozoïdes et quelques spermatogonies A indifférenciées résiduelles dans ses tubules. On postule que ces spermatogonies sont les vraies spermatogonies souches qui vont rester en attente lors de la période de spermiation et de dégénérescence du testicule du cycle précédent (de 3 à 4 mois), avant la recrudescence du prochain cycle spermatogénétique.



---

## 2. Les cellules souches germinales, à la source de la reproduction

### 2.1. Les cellules souches, seules cellules à pouvoir s'auto-renouveler et se différencier en cellules spécialisées

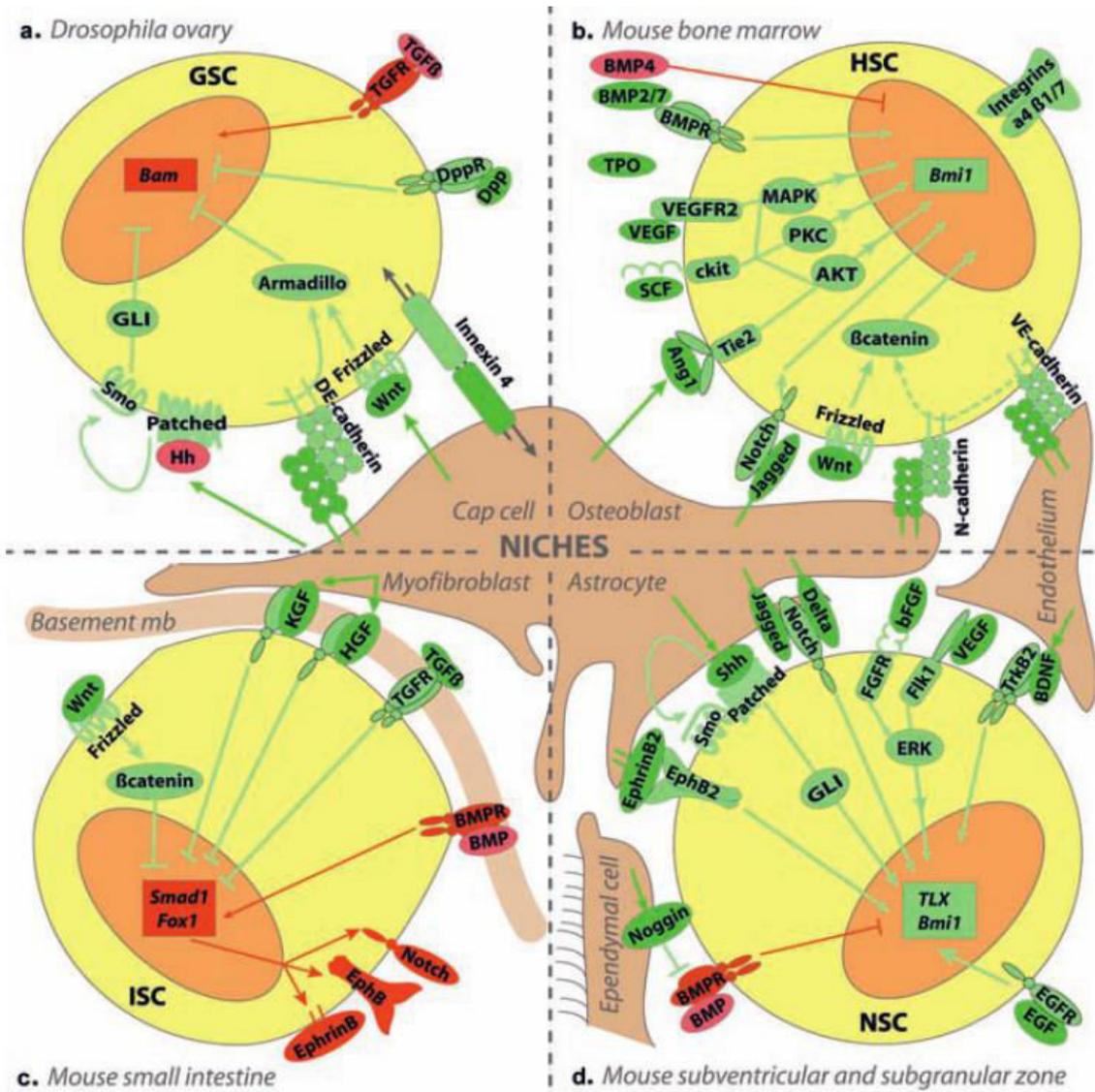
Les organismes multicellulaires (animaux et végétaux) possèdent des cellules souches à l'origine de la formation de l'organisme et du maintien de l'intégrité des tissus au cours de la vie. En effet, par leurs deux propriétés principales, l'auto-renouvellement et la différenciation, ces cellules sont les seules au sein de l'organisme à pouvoir assurer l'apport en cellules différenciées et spécialisées.

#### 2.1.1. Premières découvertes

La notion de « cellules souches » est apparue dans les journaux scientifiques dès 1868 avec Haeckels et son concept de « StamZelle », une cellule indifférenciée responsable de la production de nombreux types cellulaires pour réparer l'organisme. En 1908, le terme « cellule souche » ou « stem cell » en anglais qui peut se traduire littéralement par « cellule tige », a été proposé la première fois par un chercheur russe, Alexander Maksimov. Pourtant, ce n'est qu'en 1963 que l'existence de cellules qui s'auto-renouvellent et se différencient en cellules spécialisées a pu être démontrée, après l'observation de souris irradiées avec des doses létales pouvant survivre suite à l'injection de cellules de la moelle osseuse (TILL and McCULLOCH, 1963). Cette technique révolutionnaire pour la médecine régénérative a rapidement été utilisée avec succès chez l'homme en 1968 entre deux frères. Plus tard, les cellules souches embryonnaires (ES) ont été identifiées en 1981 chez la souris (Evans and Kaufman, 1981) et en 1998 chez l'homme (Thomson et al., 1998). Enfin, en 2006, l'équipe de Yamanaka prouve la possibilité de reprogrammer des cellules adultes différenciées en cellules souches, ce sont les Induced Pluripotent Cells (IPS) (Takahashi and Yamanaka, 2006).

On distingue les cellules souches en fonction de leur potentiel de différenciation :

- Les cellules souches totipotentes : les cellules qui peuvent redonner un organisme entier, seulement le zygote et les premières divisions des blastomères chez les mammifères
- Les cellules souches pluripotentes : des cellules qui peuvent se différencier en n'importe lequel des trois feuilletts embryonnaires, les cellules souches embryonnaires (ES)
- Les cellules souches multipotentes : des cellules souches qui peuvent former plusieurs types de cellules d'un même tissu, tels que les cellules souches hématopoïétiques.



**Figure 5 : La niche des cellules souches**

Les cellules souches résident dans un compartiment fixe, ou niche, propice au maintien de leurs propriétés souche grâce à des communications moléculaires, l'organisation spatiale des cellules et leurs adhésion entre elles. Plusieurs niches de cellules souches chez diverses espèces sont représentées ici. (Naveiras and Daley, 2006). La communication réciproque entre les cellules de la niche et les cellules souches régule l'auto-renouvellement et la différenciation de ces dernières (divisions symétriques et/ou asymétriques).

- 
- Les cellules souches unipotentes : des cellules qui n'engendrent qu'un seul type de cellules différenciées, tel que les kératinocytes de l'épiderme.

### *2.1.2. Au sein d'une niche*

Le maintien et la survie des cellules souches sont régulés finement via des communications avec leur microenvironnement, la niche des cellules souches. L'hypothèse d'une niche des cellules souches a été évoquée en 1978 par Schofield qui a proposé que ces cellules résident dans un compartiment fixe, ou niche, propice au maintien de leurs propriétés souches (Schofield, 1978). La niche va ainsi protéger les cellules souches des signaux extérieurs de différenciation, d'apoptose ou de prolifération qui pourraient dépleter le stock (sénescence précoce) ou d'induction d'une production excessive de cellules souches qui mèneraient à une tumorigenèse (Figure 5). Trois points de contrôle ont été mis en évidence. Premièrement, les signaux émis par la niche vont réguler directement l'auto-renouvellement, la différenciation et la survie des cellules souches (Xie and Spradling, 2000). Deuxièmement, l'organisation spatiale entre les cellules souches et les cellules de soutien de la niche vont pouvoir polariser les cellules souches et donc favoriser les divisions asymétriques (Deng and Lin, 1997). Troisièmement, l'adhésion entre les cellules souches et les cellules de soutien et/ou la matrice extracellulaire ancre les cellules au sein de la niche (Watt, 2002). Enfin, pour certains types souches tels que les cellules souches hématopoïétiques ou les cellules souches germinales, les cellules composantes de la niche sont capables de recruter les cellules souches via la sécrétion de facteurs d'attraction (Kollet et al., 2001). Par exemple, après transplantation de cellules hématopoïétiques dans la circulation sanguine, les cellules migrent, traversent la barrière endothéliale et colonisent la moelle osseuse (Papayannopoulou, 2003).

### *2.1.3. Différentes hypothèses de division*

Deux mécanismes de divisions des cellules souches ont été proposés : la division symétrique aboutissant à la formation de deux cellules souches filles et donc l'expansion du pool de cellules souches, ou la division asymétrique aboutissant à la formation d'une cellule souche fille et d'une cellule engagée dans la voie de différenciation, et donc l'expansion du nombre de cellules différenciées et le maintien du pool de cellules souches. La division asymétrique peut être contrôlée par deux types de mécanismes : intrinsèques et extrinsèques. Les mécanismes intrinsèques tels que la polarité cellulaire ou la ségrégation de déterminants cellulaires sont illustrés par la détermination du destin cellulaire des blastomères du zygote du nématode (*Caenorhabditis elegans*) (Maduro, 2010). Les mécanismes extrinsèques tels que la division



---

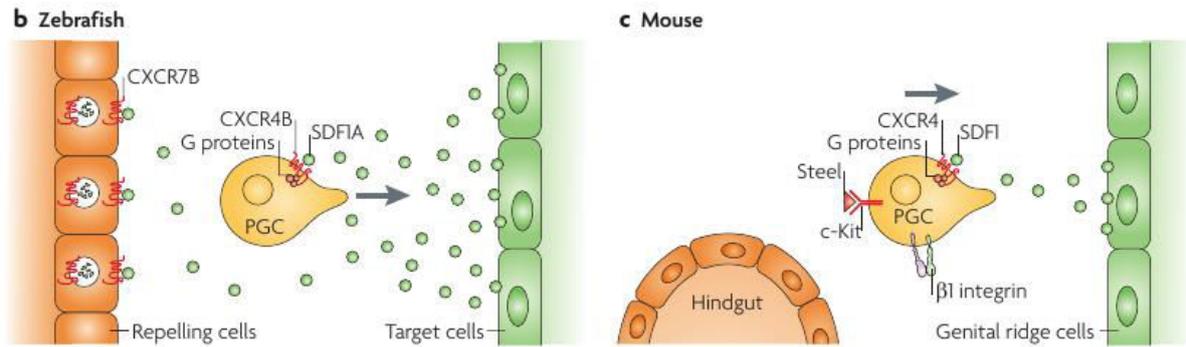
orientée qui provoque l'éloignement d'une des cellules filles des signaux émis au niveau de la niche, est illustrée par la situation des cellules souche germinales de la drosophile (Yamashita and Fuller, 2005). Les cellules souches semblent subir des divisions symétriques afin d'élargir le pool de cellules souches lors du développement embryonnaire. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques de souris doublent leur nombre chaque jour pendant le milieu de la gestation suggérant qu'au moins une fraction de ces cellules subit des divisions symétriques (Morrison et al., 1995). Chez l'adulte, il semblerait que les cellules souches se divisent asymétriquement afin de maintenir un état stable en conditions physiologiques mais que les cellules peuvent basculer pour faire des divisions symétriques et ainsi reconstituer un pool de cellules souches, ou inversement, d'accumuler des cellules différenciées en conditions pathologiques (blessures, maladies).

## **2.2. Les cellules germinales souches embryonnaires, constitution du pool initial de cellules germinales**

À l'origine des cellules souches spermatogoniales présentes dans le testicule adulte, il y a la formation de la lignée germinale lors du développement embryonnaire.

### *2.2.1. Origine de la lignée germinale*

En 1868, le biologiste allemand August Weismann évoque le concept de plasma germinal (Weismann and de Varigny, 1892). Sa théorie postule que seules les cellules germinales possèdent de l'information transmissible aux descendants, à l'opposé des cellules somatiques qui ne permettent que d'assurer les fonctions biologiques de l'organisme. Autrement dit, les cellules germinales sont à l'origine de nouvelles cellules germinales et des cellules somatiques qui ont perdu l'information germinale. Des études chez la drosophile et chez le xénope (*Xenopus tropicalis*) ont permis de montrer qu'effectivement un plasma germinal d'origine maternelle était essentiel pour le développement des cellules germinales primordiales (Illmensee and Mahowald, 1974; Smith, 1966). Dans ces organismes, le plasma germinal est constitué de mitochondries et de granules germinaux (ARNs et protéines) et va se localiser de façon asymétrique au sein de l'ovocyte. La lignée germinale est donc pré-établie avant la fécondation. Plus tard, des études ont montré que ce même mécanisme était impliqué dans la spécification de la lignée germinale chez le poisson-zèbre (Hashimoto et al., 2004; Yoon et al., 1997). Les ARNs codant pour *vasa*, ainsi que *nanos* et *dazl* sont exprimés au sein du plasma germinal (Zhou and King, 2004). Le plasma germinal va ségréger spécifiquement dans un petit groupe de cellules au cours des divisions embryonnaires constituant donc les CGPs. Un autre



**Figure 6 : Migration des cellules germinales primordiales (CGPs)**

Les cellules germinales primordiales effectuent une migration lors du développement embryonnaire afin de coloniser la gonade primordiale. Cette migration est sous le contrôle de plusieurs facteurs sécrétés par les cellules somatiques environnantes. SDF1a est un des ses acteurs qui, en se liant à son récepteur présent sur les CGPs, va guider la migration de ces dernières jusque dans leur gonade primordiale. *Issu de (Richardson and Lehmann, 2010).*

---

type de formation de la lignée germinale qui ne fait pas intervenir le plasma germinal existe aussi chez les métazoaires, l'épigenèse ou induction (Extavour and Akam, 2003). Les cellules germinales primordiales vont être induites lors de l'embryogenèse via des voies de signalisation. Ce phénomène, observé chez les mammifères, est notamment très étudié chez la souris. Les CGPs sont spécifiées entre autres par des signaux tels que le bone morphogenetic protein 4 (BMP4) émis par l'ectoderme extra-embryonnaire autour de 6,25 jpc (Lawson et al., 1999).

### 2.2.2. CGPs, migration des futures cellules germinales

Grâce à la présence d'extensions cytoplasmiques à leur surface ainsi que par l'influence de signaux émis par leur environnement, les CGPs vont pouvoir migrer au cours du développement embryonnaire jusque dans l'emplacement de la future gonade primordiale (Figure 6). Les principales molécules guidant leur migration sont : le Stromal Derived Factor 1 (SDF1A ou CXCL12), et son récepteur GPCR chemokine receptor 4b (CXCR4B) portés par les CGPs (Doitsidou et al., 2002; Knaut et al., 2003; Molyneaux et al., 2003). Il est intéressant de noter que le KO de SDF1A ou de son récepteur chez la souris ou le poisson-zèbre n'empêchent pas la migration des CGPs mais aboutit à des migrations aléatoires au sein de l'embryon, c'est-à-dire une colonisation ectopique de l'organisme par les CGPs (Ara et al., 2003; Doitsidou et al., 2002). Le knockdown de *dead end* par injection de morpholinos bloque la polarisation et les migrations des CGPs chez le poisson-zèbre. L'expression de ce gène est donc nécessaire pour que les CGPs entament leur migration (Weidinger et al., 2003) tandis que chez la souris, *dead end* n'est indispensable qu'à la survie des CGPs (Youngren et al., 2005). Une autre voie de signalisation indispensable pour stimuler la prolifération et la motilité des CGPs au moins chez les mammifères implique le kit ligand KITL (ou SCF pour Stem Cell Factor) sécrété par les cellules somatiques environnantes pendant toute la migration des CGPs et son récepteur (C-KIT) porté par les CGPs. Sans ces signaux, les CGPs sont moins nombreuses et retrouvées en dehors de la gonade (Buehr et al., 1993; Gu et al., 2009). En revanche chez les poissons, peu de données ont été obtenues sur l'implication de c-kit et de son ligand sur la prolifération des CGPs. Une première étude datant de 1999 (Parichy et al., 1999) a mis en évidence l'absence d'expression de l'orthologue *c-kit* chez le poisson-zèbre par les CGPs ainsi qu'aucun effet détecté sur le nombre de CGPs chez des individus KO pour ce gène. Plus tard, il a été montré que le poisson-zèbre possède deux paralogues de *c-kit* dont un seul semble exprimé par les CGPs (Fan et al., 2008; Mellgren and Johnson, 2005). De plus, en culture, la prolifération des CGPs est stimulée suite à un traitement au Kit ligand (Fan et al., 2008). LIF (Leukemia



---

Inhibitory Factor) est un autre facteur impliqué dans la stimulation de la prolifération des CGPs de souris du moins en culture (Cheng et al., 1994). Enfin, les CGPs montrent une très forte activité alcaline phosphatase qui est perdue au moment de la transition de ces cellules en gonocytes au sein de la gonade primordiale (14,5 jpc chez la souris) (Ginsburg et al., 1990).

### 2.2.3. *Gonocytes, formation de la gonade définitive*

Les gonocytes représentent les cellules germinales de la gonade primordiale fœtale et néonatale. Les gonocytes ne sont pas une étape de développement unique. On distingue trois stades progressifs issus d'études de marquages mitotiques et de morphométrie : le stade mitotique, transitional prospermatogonia T1 (quiescence), et transitional prospermatogonia T2 (à nouveau mitotique) (Fukuda, 1975 ; Vergouwen, 1991). Au cours de leur développement, les gonocytes vont se différencier en cellules spermatogoniales souches (SSCs), migrer du centre des tubes séminifères jusqu'à la membrane basale et proliférer tandis qu'une partie va rentrer en apoptose. Plusieurs voies de régulations entrent en jeu. Outre le rôle majeur de l'acide rétinoïque dans le déterminisme sexuel des cellules germinales (Bowles and al, 2006), cette voie serait aussi impliquée dans la stimulation de la prolifération des gonocytes et de leur apoptose (Boulogne and al, 2003). Une hypothèse proposée de ces deux rôles opposés serait qu'elle permettrait l'élimination des cellules impropres à la différenciation. Au niveau néonatal, il semblerait que le dialogue réciproque entre la 17 $\beta$ Estradiol (E2) et le Platelet Derived Growth Factor (PDGF) induit la stimulation de la prolifération des gonocytes (Li and al, 1997 ; Thuillier and al, 2004). Ces cellules expriment des marqueurs considérés comme marqueurs de cellules souches embryonnaires, tels que des marqueurs de surface : Stage Specific Embryonic Antigen 1 (SSEA1), THY1 (CD90), TRA98 et des facteurs de transcriptions : POU5F1 (OCT4), NANOG, SOX2, STELLA (Culty, 2009). En particulier, POU5F1, initialement considéré comme un marqueur des cellules souches embryonnaires (de la masse cellulaire interne des blastocystes mais aussi de l'endoderme primitif), a ensuite été montré avec une expression restreinte à la lignée germinale dès 7,5 jpc chez la souris grâce à l'utilisation de lignée transgénique prom*Oct4::GFP* (Nichols et al., 1998; Ohbo et al., 2003; Ohmura et al., 2004). Son expression est ensuite conservée dans les cellules germinales primordiales, gonocytes et cellules souches spermatogoniales (SSCs). THY1 (CD90), originellement découvert pour son expression dans les cellules souches hématopoïétiques et plus tard dans les cellules souches embryonnaires, est exprimé par les gonocytes néonataux ainsi que les SSCs (Ling and Neben, 1997). Les gonocytes triés sur ce marqueur ont été capables de former des colonies après des expériences de transplantation confirmant qu'au moins une fraction des cellules THY1<sup>+</sup> sont des cellules



---

souches (Ryu et al., 2004). Enfin, NANOG, SOX2 et STELLA dont l'expression a été premièrement démontrée dans les cellules souches pluripotentes embryonnaires (ES) et dans les CGPs, sont aussi exprimés par les gonocytes avec une perte progressive de leur expression lors de la transition en spermatogonies (Goel et al., 2008; Mitsui et al., 2003; Payer et al., 2006; Saitou et al., 2002). De même que pour la migration des CGPs, la voie C-KIT / KIT LIGAND est indispensable à la migration des gonocytes de la lumière du tube séminifère à la lame basale (Ohbo et al., 2003; Orth et al., 1997).

Chez les poissons, on ne distingue pas à proprement parler une population de gonocytes avec une localisation particulière au sein des cordes séminifères ainsi qu'une expression de marqueurs qui permettent de les distinguer des spermatogonies ou des CGPs. Le terme gonocyte est largement utilisé pour désigner les cellules germinales bipotentes (mâle ou femelle) présentes dans la gonade. Chez la truite, les gonocytes représentent donc la population germinale jusque 55-60 jpf où l'on distingue les premières méioses femelles. Cette nomenclature n'est pas adoptée par tous, et apparaît donc très dépendante de la différenciation sexuelle tardive, très variée chez les poissons. Il est intéressant de remarquer que chez la truite, 50 CGPs sont détectées dans la gonade au moment de l'éclosion et qu'une prolifération spécifique de ces cellules a lieu pendant les premiers jours après éclosion (Lebrun et al., 1982; Nagler et al., 2011). Ces proliférations pourraient être analogues aux proliférations spécifiques des gonocytes.

### **2.3. Les cellules germinales souches adultes, support de l'apport continu en gamètes matures**

Lors de l'embryogenèse, des signaux vont spécifier la voie mâle (spermatogonies souches) ou femelle (ovogonies souches) des CGPs chez les mammifères et plus tardivement lors du développement gonadique chez les poissons.

#### *2.3.1. Des ovogonies souches adultes ?*

Un sujet qui fait toujours débat actuellement est la présence ou non de cellules souches ovogoniales (OSCs) chez la femelle adulte des mammifères. Chez les espèces non-mammaliennes telles que la drosophile ou les poissons, plusieurs études ont permis de clairement démontrer la présence d'OSCs chez l'adulte. Biologiquement, la présence de ces cellules semble une nécessité pour les espèces produisant une quantité importante d'œufs nécessaires au succès de la reproduction (Woods and Tilly, 2013). Comme la gonade mâle (voir



---

chapitre suivant), l'ovaire de drosophile est régionalisé avec la présence des ovogonies souches au niveau du pôle antérieur des ovarioles. Cette région est appelée germarium. Les OSCs sont maintenues aux cellules somatiques de la coiffe via des jonctions adhérentes. La formation du follicule correspond à l'évènement de division asymétrique de l'OSC qui donne une nouvelle OSC ainsi qu'une cellule engagée dans la différenciation, le cystoblaste (Kirilly and Xie, 2007). Chez le médaka, un poisson téléostéen, il a également été récemment prouvé la présence d'ovogonies souches au niveau d'une zone germinative, grâce en particulier à l'utilisation d'une lignée *nanos2::GFP* (Nakamura et al., 2010). L'identification d'OSCs n'a pour le moment pas encore été démontrée au niveau moléculaire chez d'autres espèces de poissons, mais d'autres évidences quant à leur présence ont été rapportées. Par exemple, des expériences d'ovariectomie chez la carpe de roseau ont permis de montrer une régénération du tissu ovarien, phénomène aussi observé pour la truite arc-en-ciel (Kersten et al., 2001). Enfin, en utilisant des lignées transgéniques de poisson-zèbre induisant l'ablation sélective de presque toute la population d'ovocytes chez l'adulte, une rapide dégénérescence de l'ovaire est observée mais, si l'inhibition est levée, les ovocytes sont régénérés (White et al., 2011). C'est la publication de Zuckerman en 1951 qui fixe le dogme d'une population d'ovocytes fixe définie à la naissance chez les mammifères (Mandl and Zuckerman, 1951). Pourtant, en 2004, Johnson *et al.* ont proposé que des OSCs chez l'adulte contribuaient au maintien de la réserve folliculaire post-natale en déterminant que le taux d'atrésie estimé chez l'adulte dépassait nettement le nombre de follicules fixés à la naissance (Johnson et al., 2004), résultats qui avaient déjà été montrés 50 ans plus tôt par Vermande-Van Eck en 1956 mais largement ignorés (VERMANDE-VAN ECK, 1956). Plusieurs équipes ont ensuite démontré la présence des OSCs dans l'ovaire de mammifères notamment par des expériences d'isolation de ces cellules puis de leur transplantation (Pacchiarotti et al., 2010; White et al., 2012; Zou et al., 2009). Pourtant, ces données sont encore vivement critiquées.

### 2.3.2. *Les cellules spermatogoniales souches*

Ces cellules sont issues des gonocytes au niveau post-natal et vont se maintenir pendant toute la vie de l'individu au sein de leur niche germinale (Huckins and Clermont, 1968; McLean et al., 2003). Une hypothèse avancée étant que chez la souris, une fraction des gonocytes vont donner des spermatogonies directement différenciées qui seront le support du premier cycle de la spermatogenèse, et une fraction de cellules qui va donner les SSCs qui seront le support des autres cycles spermatogénétiques (de Rooij, 1998). Similaires aux autres populations de cellules souches de l'organisme, ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier.



---

Les SSCs sont présentes en petit nombre dans le testicule mature en comparaison des autres types germinaux (évalué à 1 SSC pour 3000 cellules germinales) (Tegelenbosch and de Rooij, 1993). Bien que l'existence de ces cellules dans le testicule soit proposée depuis longtemps et que la présence de populations hétérogènes de spermatogonies ait été observée en histologie, ce n'est que la mise au point de la technique de transplantation des SSCs par Brinster en 1994 qui a permis de démontrer qu'au sein du testicule, il existe une population de spermatogonies souches capable de recoloniser les tubules mais surtout capable de proliférer et de se différencier en cellules germinales matures (Brinster and Zimmermann, 1994). Un ensemble de marqueurs intracellulaires (NANOS2, PLZF,...), de marqueurs membranaires (GFRA1, THY1,...) permettent de préciser la population de SSCs au sein des spermatogonies. Les efforts sont maintenant concentrés pour trouver un marqueur unique des cellules souches les plus indifférenciées. Une autre niche germinale largement étudiée est la niche testiculaire de la drosophile avec l'identification de marqueurs spécifiques et de voies de signalisation (Spradling et al., 2011). En revanche, très peu d'études ont été menées chez les poissons pour identifier et étudier les SSCs. Dans les deux derniers chapitres, les données sur l'identité et la régulation des SSCs seront développées en récapitulant les informations obtenues à partir des deux modèles les plus étudiés, drosophile et souris et en introduisant les quelques données acquises chez les poissons sur le sujet.

### *2.3.3. Plasticité phénotypique des cellules germinales souches*

Chez la souris, on suppose que les SSCs sont les spermatogonies A single (As, spermatogonies A isolées), tandis que les A paired (Apr) et A aligned (Aal) sont issues de leurs divisions et sont reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques. Apr et Aal sont considérées comme des progéniteurs engagés dans la voie de différenciation (Huckins and Oakberg, 1978). Cependant, plusieurs études tendent à montrer que ce dogme n'est pas immuable. Premièrement, les cellules Apr à Aal peuvent aussi recoloniser et proliférer après transplantation traduisant donc un caractère des cellules souches (Nakagawa et al., 2010). Ce qui ressort aussi de ces résultats est que le caractère souche est progressivement perdu lorsque les cellules s'engagent dans la voie de différenciation mais que ces cellules peuvent tout de même être sensibles à des signaux extérieurs et se dédifférencier. Deuxièmement, des gènes considérés comme essentiels et spécifiques au fonctionnement des SSCs comme GFRA1, PLZF, NANOS2 ne sont pas restreints à une expression unique par les cellules As (Buaas et al., 2004; Nakagawa et al., 2010; Suzuki et al., 2009). Dernièrement, l'imagerie en temps réel et lignage cellulaire ont permis de montrer que comme chez la drosophile, des spermatogonies interconnectées par des ponts



---

cytoplasmiques peuvent se fragmenter en spermatogonies isolées ou en plus petit cystes (Barroca et al., 2009; Nakagawa et al., 2010). Une hypothèse pour expliquer cette hétérogénéité de caractéristiques et d'origine cellulaire a été proposée pour plusieurs types de cellules souches : deux populations de cellules souches, les « actual stem cells » qui s'auto-renouvellent et les « potential stem cells » qui sont capables d'auto-renouvellement mais ne le font pas en conditions normales (Cai et al., 1997; Potten and Loeffler, 1990). Il est maintenant proposé et admis par certains qu'au sein du testicule co-existent ces deux populations cellulaires de SSCs. Enfin, ces cellules semblent maintenir des caractéristiques de pluripotence. Des expériences de culture à long terme de SSCs isolées de testicule post-natal (Kanatsu-Shinohara et al., 2004), mais aussi de testicule adulte (Glaser et al., 2008; Guan et al., 2006), ont permis de montrer le développement de quelques colonies similaires à des cellules souches embryonnaires (ES). Ces ES-like peuvent donner des tissus des trois feuilletts embryonnaires créer un tératocarcinome quand elles sont injectées sous la peau et participer au développement embryonnaire si elles sont injectées dans un blastocyste de souris (Ko et al., 2009). Ces cellules sont appelées « multipotent germline stem cells » (mGSCs). Ces observations ont aussi été confirmées pour les cultures de SSCs humaines (Conrad et al., 2008; Dym et al., 2009; Izadyar et al., 2011). Ces résultats impliquent donc que les cellules souches spermatogoniales pourraient être utilisées comme une source alternative de cellules souches pluripotentes en thérapie cellulaire en s'affranchissant des considérations éthiques sur l'origine des cellules souches embryonnaires et sur les inquiétudes relatives à la reprogrammation des IPS (Induced Pluripotent Stem cells).

Bien que chez les poissons, la population de spermatogonies souches ne soit pas identifiée, des expériences de transplantation de cellules spermatogoniales telles que les cellules testiculaires de truite triées grâce à l'expression de GFP sous le contrôle du promoteur *vasa* ont bien montré qu'au sein de ces cellules une population avait des propriétés souches puisqu'elles étaient capables de rétablir une spermatogenèse fonctionnelle. Un point intéressant à remarquer est que des spermatogonies issues d'animaux adultes et transplantés dans des embryons femelles lors de la phase de migration des CGPs ont colonisé, proliféré et se sont différenciées en ovocytes matures. Les cellules souches spermatogoniales de poissons ne seraient pas restreintes à donner des spermatogonies mais pourraient aussi, suivant les signaux extérieurs, être reprogrammées en ovogonies souches et donc être bipotentes (Okutsu et al., 2006).



---

### 3. Identité des cellules spermatogoniales souches (SSCs)

Les cellules spermatogoniales souches sont le support de la production continue et en quantité de gamètes matures. Les SSCs sont identifiables en combinant plusieurs caractéristiques de cellules souches :

- des cellules en petit nombre et au sein d'une niche,
- des propriétés fonctionnelles liées à leur rôle souche,
- des marqueurs spécifiques.

#### 3.1. Une sous-population au sein des spermatogonies

##### 3.1.1. La zone germinative de la gonade régionalisée

La drosophile possède une organisation de la gonade régionalisée. À l'extrémité distale des filaments testiculaires se situent les cellules du hub auxquelles sont ancrées les spermatogonies souches. La spermatogenèse se déroule au sein de cystes avec une onde spermatogénétique orientée de l'extrémité distale vers l'extrémité proximale contenant les gamètes matures (White-Cooper and Bausek, 2010). La division asymétrique de la spermatogonie souche au niveau de la coiffe induit la formation d'une cellule spermatogonale fille, et d'une cellule progénitrice, le gonialblaste. C'est l'orientation particulière de cette division qui détermine quelle cellule restera souche sous l'influence des signaux émis par les cellules du hub et quelle cellule sera engagée dans la différenciation (Yamashita et al., 2003). La cellule qui s'éloigne des signaux émis par les cellules du hub est la cellule progénitrice. Le gonialblaste ainsi produit est entouré de deux cellules somatiques, les cellules péricystiques. Au sein de ce cyste nouvellement formé, les spermatogonies vont subir quatre mitoses avec une cytodièrese incomplète (des ponts cytoplasmiques relient les clones de spermatogonies). Un organite spécifique de la lignée germinale chez la drosophile, le spectrosome, uniquement exprimé par les SSCs (Kai et al., 2005; Kibanov et al., 2013), se transforme en fusome dans les spermatogonies filles différenciées (deCuevas et al., 1996). Ces deux organites identifiables en microscopie électronique peuvent être aussi détectés en microscopie classique via l'utilisation d'anticorps spécifiques de leurs protéines constitutives, notamment les spectrines alpha et beta. Grâce à ces outils, il a pu être montré que des cellules engagées dans la voie de différenciation pouvaient revenir à un état souche (Kai and Spradling, 2004), ce qui a été confirmé ensuite par des travaux d'imagerie en temps réel (Sheng and Matunis, 2011). Ces travaux ont aussi permis

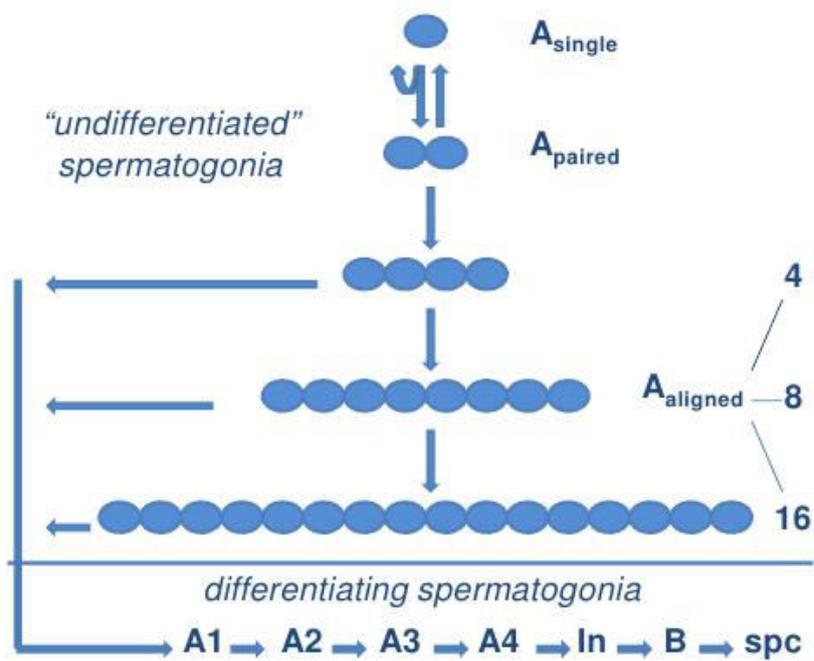


---

de montrer qu'une proportion des SSCs se renouvellent par division symétrique mais qu'elles restent minoritaires (20%) en conditions physiologiques.

Cette organisation régionalisée de la gonade est aussi observable chez les poissons cartilagineux (chondrichthyens) et chez certains téléostéens possédant un testicule de type restreint. Chez la roussette (*Scyliorhinus canicula*), le développement des cellules germinales est synchrone au sein de cystes délimités par une lame basale et contenant de 480 à 500 spermatoblastes disposés autour d'une lumière centrale (Loir et al., 1995; Sourdain and Jégou, 1993). Les progéniteurs germinaux sont initialement formés dans la zone germinative au niveau de la face dorsale du testicule. Tout en s'associant, les progéniteurs germinaux et les cellules de Sertoli vont migrer au sein du testicule pour former les spermatoblastes et les cystes. Au sein de la zone germinative, on observe des spermatogonies isolées présentant un noyau de taille importante, d'aspect marbré avec un nucléole bien visible, un cytoplasme comportant de nombreuses mitochondries associées au nuage germinal et la présence de spectrosomes. Au moins une fraction, si ce n'est toute la population de ces cellules, constitue la population de SSCs chez la roussette. On retrouve dans cette zone au maximum des cystes de quatre plus petites spermatogonies, interconnectées par des ponts cytoplasmique associés au fusome et présentant toujours des mitochondries et du nuage (Loppion et al., 2008). Le nuage est un organite spécifique des cellules germinales composé d'ARNs et protéines spécifiques tels que *vasa*, *piwi* et *nanos* (Gao and Arkov, 2013) et correspondrait au plasma germinal de l'embryon. De par cette composition moléculaire, le rôle probable de cet organite serait d'accumuler une réserve d'ARNm nécessaires plus tard dans la biologie de la cellule, mais aussi de limiter l'action des rétrotransposons (Chuma et al., 2009).

Chez le médaka, le testicule est de type restreint. Les cystes à spermatogonies sont localisés à l'extrémité distale en bordure de l'albuginée. Les cystes évoluent en migrant de la périphérie au centre du testicule où seront collectés les spermatozoïdes. Bien qu'aucune recherche n'a été menée pour caractériser les spermatogonies souches chez cette espèce, on identifie bien les spermatogonies A de type indifférenciées à l'extrémité distale d'un filament testiculaire où elles sont séparées les unes des autres par des cellules de Sertoli (Grier, 1976).



**Figure 7 : Division des spermatogonies chez les rongeurs - modèle d'Huckins and Oakberg.**

Dans ce modèle, les spermatogonies souches sont les spermatogonies A single ( $A_s$ ). Certaines divisions de  $A_s$  incomplètes aboutissent à la formation de deux spermatogonies reliées par des ponts inter-cytoplasmiques, les  $A_{\text{paired}}$ . Ces dernières subiront à nouveau des divisions formant ainsi successivement les A aligned ( $A_{\text{al}}$ ) 4, 8 et 16. Les  $A_{\text{al}16}$  se différencient ensuite sans étape de mitose en spermatogonie A1.  $A_s$ ,  $A_{\text{pr}}$  et  $A_{\text{al}}$  sont toutes considérées comme des cellules indifférenciées. Cependant les  $A_s$  sont considérées comme les vraies cellules souches et les autres comme des progéniteurs plus ou moins engagés dans la voie de différenciation.

---

### 3.1.2. *Modèle de Clermont ou d'Huckins chez les rongeurs, deux théories sur l'identité des SSCs*

Chez les mammifères, la spermatogenèse est un processus cyclique qui a lieu dans les tubules séminifères de la gonade entière. Les SSCs sont présentes en faible quantité (1 sur 3000 cellules germinales) chez la souris et sont localisées au niveau de lame basale en étroite communication avec les cellules de Sertoli. Il y a donc environ 10 000 SSCs estimées dans un testicule adulte (Tegelenbosch and de Rooij, 1993). Deux modèles ont été proposés pour expliciter les divisions mitotiques conduisant à la production d'un grand nombre de spermatogonies différenciées à partir des cellules spermatogoniales souches. Clermont et Bustos-Obregon ont proposé en 1968 qu'il existe deux classes de cellules souches spermatogoniales : une population réserve de cellules souches (dénommées spermatogonies A0, et isolées) et une population de cellules souches en renouvellement : les spermatogonies A1 à A4 formant une boucle d'amplification (Clermont and Bustos-Obregon, 1968). Dans ce modèle, les spermatogonies A1 à A4 conservent leurs propriétés souche et les spermatogonies A4 sont capables soit de redonner une spermatogonie A1 soit de poursuivre le processus de différenciation et de donner des spermatogonies A1 intermédiaires (Aint) puis B. Ce modèle correspond à la théorie d'une population de SSCs qui ne prolifèrent pas en conditions physiologiques, les « potential stem cells » versus une population de SSCs qui assurent la production continue de cellules germinales différenciées, les « actual stem cells » (Yoshida et al., 2007). Un autre modèle a été proposé dans les années 70 : le modèle de Huckins et Oakberg (Huckins and Oakberg, 1978) (Figure 7). La phase de prolifération des spermatogonies A débute à partir de cellules souches germinales isolées, les spermatogonies A single (As). Elles sont localisées au niveau de la membrane basale des tubules séminifères, et prolifèrent lentement par mitose pour s'auto-renouveler. Certaines As se divisent de manière incomplète pour former deux spermatogonies Apr (spermatogonies A paired) reliées par un pont inter-cytoplasmique et engagées dans la voie de différenciation. Ensuite, ces dernières se divisent à nouveau pour former des chaînes de 4, 8, ou 16 spermatogonies indifférenciées Aal (A aligned) de plus en plus engagées dans la voie de différenciation. Puis, elles progressent durant une série de six divisions mitotiques en spermatogonies A1 (c'est la première génération de spermatogonies indifférenciées), A2, A3, A4 puis Aint et enfin en spermatogonies B (2n) qui entrent en méiose et se différencient en spermatocytes I (4n). L'étape de différenciation des spermatogonies Aal à A1 se fait sans mitose (Oatley and Brinster, 2008). A l'heure actuelle, le modèle de Huckins et Oakberg prévaut pour décrire la prolifération des spermatogonies à partir des spermatogonies souches et correspond



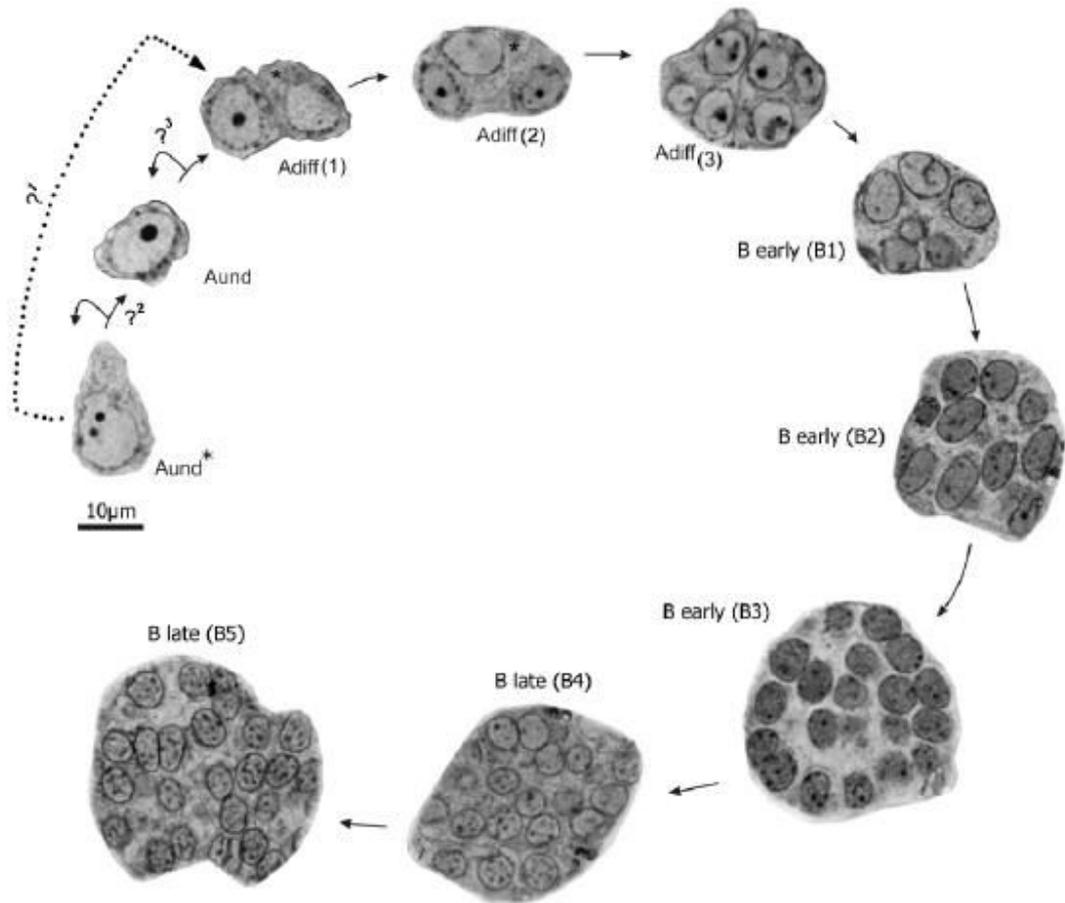
---

à la situation histologique observé *in situ*. Des analyses morphologiques fines ont ensuite permis de décrire des différences entre l'aspect des spermatogonies indifférenciées (As à A4) de celui des spermatogonies différenciées (à partir d'A1). Elles possèdent un cytoplasme peu dense avec des mitochondries nombreuses et volumineuses et un noyau de forme plutôt ovale avec un nucléole d'aspect marbré. Certaines zones du noyau à proximité de l'enveloppe nucléaire sont dépourvues d'hétérochromatine. Par comparaison, les spermatogonies A1 et A4 montrent un cytoplasme légèrement plus dense, un noyau plus rond qui possède jusqu'à deux nucléoles opaques bien distinguables et contenant de plus en plus d'hétérochromatine (aspect marbré) (Chiarini-Garcia and Russell, 2002). Pour finir, les spermatogonies B ne sont plus en contact avec la lame basale, présentent un noyau rond dont la membrane interne est entièrement bordée d'hétérochromatine. Au cours de ces différentes divisions, les cellules germinales qui sont issues d'une même As initiale restent interconnectées via des ponts inter-cytoplasmiques formant ainsi un syncytium. Il est intéressant de noter que les spermatogonies indifférenciées ne semblent pas localisées aléatoirement au sein des tubes séminifères mais sont retrouvées à proximité de la membrane basale qui fait face à l'interstitiel et aux vaisseaux sanguins (Chiarini-Garcia et al., 2003).

Cette classification des spermatogonies et ces aspects morphologiques semblent le modèle majoritaire chez les mammifères comme l'ont montré de récentes études chez le peccary (*Tayassu tajacu*, un artiodactyle, groupe qui inclut entre autres les camélidés, bovidés, suidés,...) et chez les équidés (groupe des perissodactyles) (Campos-Junior et al., 2012; Costa et al., 2012). La distinction entre spermatogonies différenciées et indifférenciées a pu être observée mais une population hétérogène de spermatogonies indifférenciées contenant donc une sous-population de cellules souches n'a pas pu être mise en évidence.

### 3.1.3. *Apale ou Adark chez les primates ?*

Chez les primates, l'aspect morphologique des spermatogonies est très différent. Sur la base histologique et de leur prise de coloration à l'hématoxyline, deux types de spermatogonies indifférenciées sont proposées : les Adark (sombre) et les Apale (plus clair) (Clermont and Antar, 1973; CLERMONT and LEBLOND, 1959). Les Adark sont considérées comme le compartiment souche et les Apale sont à l'origine des spermatogonies différenciées de type B qui donneront les spermatoctes pré-leptotènes (Hermann et al., 2010). Différents modèles d'amplification et d'auto-renouvellement des spermatogonies sont proposés pour l'homme et sont basés sur le faible taux de prolifération des spermatogonies Adark. Le premier modèle



**Figure 8 : Divisions des spermatogonies chez le poisson-zèbre**

Deux types de spermatogonies A indifférenciées (et isolées) sont observés dans le testicule de poisson-zèbre (Aund\* et Aund). Les Aund\*, considérées comme les plus précoces, sont des grosses cellules avec un noyau plutôt ovale et peu de chromatine visible. Les Aund sont considérées progénitrices, ont un noyau plus rond et plus d'hétérochromatine dans le noyau. La prolifération de ces dernières aboutit à la formation des spermatogonies A différenciées (2, 4 et 8,) puis s'ensuit la formation des spermatogonies B, encore plus petites pour arriver à la formation de cystes contenant jusqu'à 256 spermatogonies. Issu de (*Leal et al, 2009*).

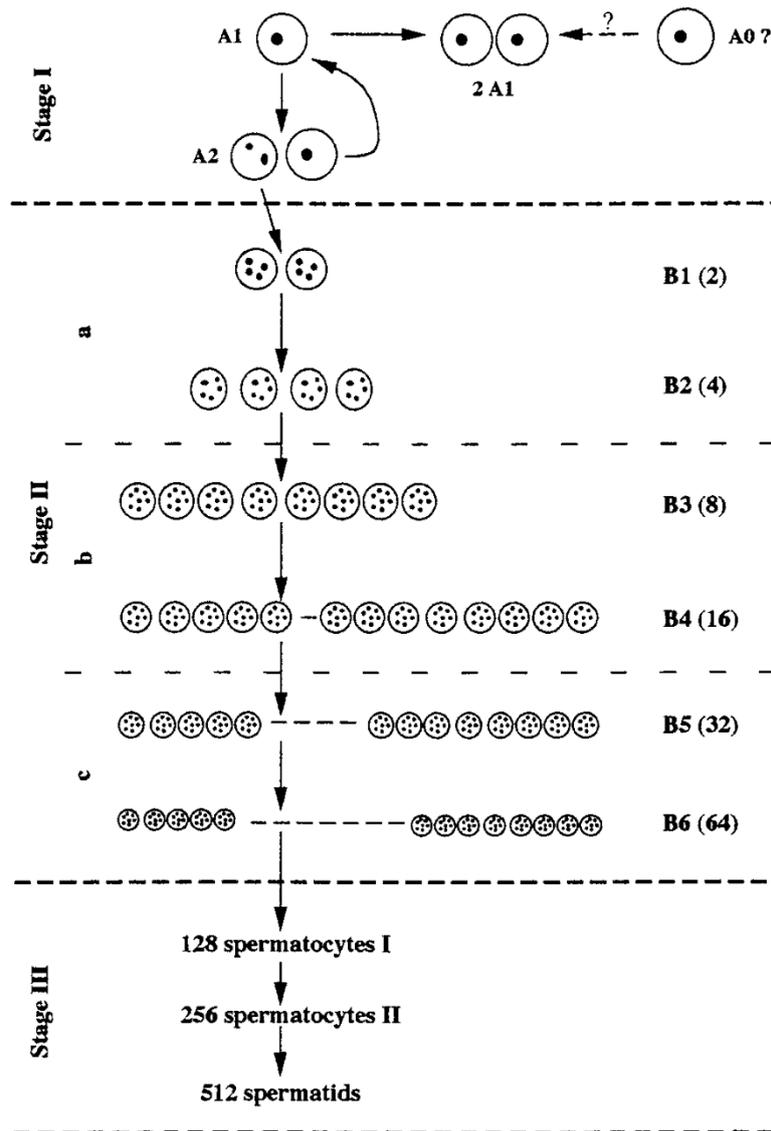
---

propose deux types de divisions des spermatogonies Apale au cours d'un cycle, l'un étant amplificateur, l'autre différenciateur (Clermont, 1966a, 1966b). Le modèle proposé par Ehmcke & Schlatt, (2006) (Ehmcke and Schlatt, 2006) repose également sur deux événements mitotiques des Apale au cours d'un cycle, avec au stade VII une première division d'un clone de 4 Apale en un clone de 8 Apale, qui se fragmente ensuite en un clone de 4 Apale et en 2 clones de 2 Apale. Ces clones se divisent ensuite au stade IX pour donner des clones de 8 et 4 spermatogonies B1 (voie de la différenciation) et un clone de 4 Apale (auto-renouvellement) (Ehmcke and Schlatt, 2006; Simorangkir et al., 2009). L'organisation clonale des spermatogonies Adark et Apale reste cependant difficile à établir sur la base de l'arrangement topographique de ces cellules qui peuvent être retrouvées isolées et en groupes de 2 à plus de 16 spermatogonies de type A (Hermann et al., 2010).

#### *3.1.4. Dans la gonade cystique des poissons téléostéens, des spermatogonies A isolées*

Il existe presque autant de classification des spermatogonies que d'espèces de vertébrés. Cette hétérogénéité des nomenclatures mais aussi des nombres de divisions mitotiques et des critères de classification sont à prendre en compte pour la comparaison de la spermatogenèse et plus particulièrement pour l'identification des spermatogonies souches entre espèces. Une spermatogonie A chez la souris ne correspondra probablement pas à la définition d'une spermatogonie A chez les poissons téléostéens. Et cette divergence de nomenclature est aussi retrouvée entre espèces de poissons. Chez les poissons téléostéens, les testicules sont organisés en cystes et sont majoritairement de type non restreint. La spermatogenèse a donc lieu dans tout le testicule au sein des tubes séminifères, et ressemble donc plus à la morphologie du testicule mammalien.

Chez le poisson-zèbre, les spermatogonies indifférenciées sont subdivisées en deux types, les Aund\* et les Aund (Figure 8). Ces cellules sont caractérisées par un volume cellulaire important, un large noyau, une chromatine très peu condensée et la présence d'un ou deux nucléoles (Leal et al., 2009). Les Aund\* sont considérées comme les plus précoces (et incluraient donc les SSCs) avec un noyau plus ovale avec peu d'hétérochromatine au niveau de la membrane nucléaire. S'ensuit la formation des spermatogonies différenciées (Adiff) avec un noyau plus petit, plus dense présentant des amas d'hétérochromatine qui apparaissent en bordure de la membrane nucléaire. Trois cycles de divisions des spermatogonies Adiff (2, 4, 8) vont conduire à la formation des spermatogonies B encore plus petites avec une hétérochromatine de plus en plus visible et condensée au bord de la membrane interne du noyau.



**Figure 9 : Modèle de division des spermatogonies de truite arc-en-ciel, proposé par Loir (1999).**

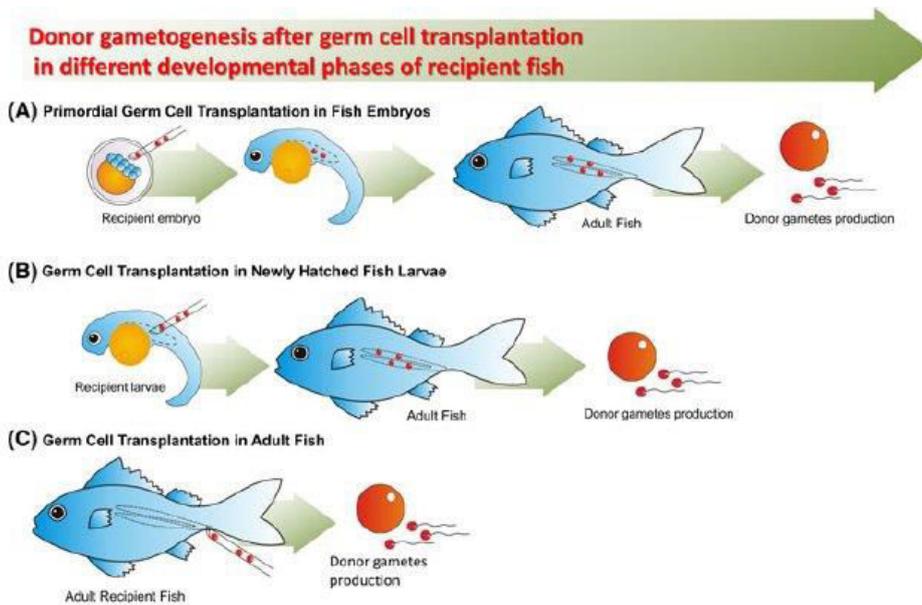
Deux types morphologiques de spermatogonies A sont observés dans le testicule de truite : les A1, ne possédant qu'un seul nucléole clairement visible, et les A2, plus petites, et avec plus d'hétérochromatine ainsi que 2 à 3 nucléoles dans le noyau. Dès qu'un cyste contient plus d'une spermatogonie, ces cellules sont considérées comme engagées dans la différenciation et nommées spermatogonies B. 6 divisions successives de la spermatogonie A initiale aboutit à la formation de 64 spermatogonies B maximum au sein d'un cyste. Parmi la population de spermatogonies A1, Loir propose la présence d'une population A0 qui serait les cellules souches spermatogoniales. Aucun marqueur morphologique ne permet de différencier A1 et A0.

---

De 8 spermatogonies Adiff estimées, il va y avoir une succession de 5 divisions qui pourrait conduire à la formation du nombre maximal de 256 spermatogonies au sein du cyste (208 dénombrées au maximum). Il est intéressant de souligner que le nombre de Sertoli augmente avec la taille du cyste. En effet, chez les poissons, le nombre de cellules de Sertoli n'est pas fixé lors du développement embryonnaire à l'inverse de la situation chez les mammifères (Orth et al., 1988; Schulz et al., 2010). Les Sertoli prolifèrent ou meurent en fonction des besoins de la spermatogénèse. Il y a donc probablement au sein du testicule une population de cellules souches somatiques à l'origine des Sertoli. Chez d'autres téléostéens modèles comme le tilapia (*Oreochromis niloticus*), une classification équivalente mais moins précise des sous-populations spermatogoniales a été établie (Santos Nassif Lacerda et al., 2013; Schulz et al., 2010). Trois types de spermatogonies sont identifiés, les spermatogonies indifférenciées Aund, les différenciées Adiff et les spermatogonies de type B. Les spermatogonies Aund sont caractérisées par la faible densité de chromatine notamment au niveau de la membrane nucléaire et présentent 1 à 2 nucléoles. Le « nuage », organite caractéristique des cellules germinales est observé dans le cytoplasme en association avec de nombreuses mitochondries. Chez les salmonidés comme la truite arc-en-ciel, aucune étude n'a permis de différencier une population de cellules indifférenciées et une population de cellules différenciées au sein des spermatogonies A. De plus, Loir a établi une classification des spermatogonies différentes des deux premiers modèles cités précédemment (poisson-zèbre et tilapia) (Loir, 1999) (Figure 9). Il distingue les spermatogonies A des spermatogonies B par le nombre de cellules présentes au sein d'un cyste et l'absence de nucléole clairement visible au sein des spermatogonies B. Dès qu'un cyste est composé de plus d'une cellule, ces cellules sont considérées comme des spermatogonies B. De la spermatogonie A isolée initiale, il observe la formation de cystes contenant jusque 64 spermatogonies, soit 6 divisions mitotiques. Il observe cependant une certaine hétérogénéité au sein des spermatogonies A, avec les A1 ne possédant qu'un seul nucléole clairement visible et les A2 plus petites avec plus d'hétéchromatine et 2 à 3 nucléoles dans le noyau. Il propose aussi l'existence de cellules A0 quiescentes (qui seraient morphologiquement incluses dans les A1), les cellules spermatogoniales souches.

### **3.2. Des caractéristiques fonctionnelles liées à leurs propriétés de cellules souches**

Les cellules souches ont deux grandes propriétés : l'auto-renouvellement et la différenciation. Ces deux caractéristiques peuvent être analysées *in vivo* et/ou *in vitro* via plusieurs outils



**Figure 10 : Trois techniques de transplantation de cellules germinales sont développées chez les poissons.**

La première technique consiste à transplanter une ou plusieurs cellules germinales dans un embryon au stade blastula. Une autre technique consiste à transplanter des cellules germinales dans la cavité péritonéale d'un embryon juste avant l'éclosion (période de migration des CGPs endogènes). La dernière technique consiste à transplanter des cellules germinales chez l'adulte via la papille génitale. Issu de *Lacerda et al, 2013*.

---

biotechnologiques et permettent donc de vérifier la présence de cellules souches au sein d'une population cellulaire.

### *3.2.1. Transplantation, test pour la colonisation de la niche, l'auto-renouvellement et la différenciation des SSCs*

Les cellules souches hématopoïétiques sont capables de recoloniser leur niche après transplantation (Frimberger et al., 2001; Stewart et al., 1993). Cette propriété singulière est liée à leur capacité à répondre à des signaux extérieurs qui vont diriger leur cheminement au sein de l'organisme. Après colonisation de la niche, les cellules souches vont participer à l'hématopoïèse de l'individu receveur, et vont donc s'auto-renouveler afin de maintenir leur stock et/ou se différencier en cellules spécialisées. Couplée à des techniques de marquage/lignage cellulaire (patrimoine génétique, transgénèse, marqueur membranaire,...), la transplantation permet donc de tester l'aptitude souche d'une population cellulaire en suivant leur devenir au sein d'un individu receveur. Comme les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souche germinales sont aussi capables de recoloniser activement la niche germinale après transplantation. En effet, la première transplantation réussie au niveau de la biologie de la reproduction date de 1993 avec l'expérience de Tajima et al qui a transplanté des CGPs isolées de poulet dans le flux sanguin d'embryons en développement. Les individus receveurs sont devenus des chimères au niveau de leur lignée germinale, et après maturité sexuelle ont permis de produire des descendants issus des cellules donneuses (Tajima et al., 1993). Peu de temps après, un système de transplantation de cellules germinales a été établi chez les rongeurs par Brinster and Zimmermann (Brinster and Zimmermann, 1994). Cette méthode consiste à utiliser une suspension cellulaire issue d'un testicule (donneur), et à l'injecter directement dans les tubes séminifères d'une souris stérile (receveur). Des SSCs présentes dans la suspension cellulaire injectée ont été capables de coloniser le testicule du receveur, de rétablir et maintenir la spermatogenèse chez le receveur stérile. La transplantation de spermatogonies (dont des SSCs) a aussi pu être réussie dans de nombreuses autres espèces de mammifères telles que les chèvres (Honaramooz et al., 2002), moutons (Rodriguez-Sosa et al., 2006), bovins (Izadyar et al., 2003), cochons (Mikkola et al., 2006), singes (Schlatt et al., 2002), et les félins (Silva et al., 2012).

La transplantation de cellules germinales souches a aussi été fortement développée chez les poissons via l'utilisation de plusieurs méthodes d'injection de ces cellules (Figure 10). Une des méthodes consiste en la transplantation de CGPs directement dans un embryon receveur au



---

stade blastula. En parallèle, le développement endogène de la lignée germinale chez l'embryon receveur est bloqué via l'inactivation du gène *dead end*. Cette technique va donc aboutir au remplacement total de la lignée germinale du receveur avec les cellules germinales transplantées du donneur (Ciruna et al., 2002; Saito et al., 2008). Une autre technique repose sur la transplantation de cellules germinales isolées par micro-injection dans la cavité péritonéale d'un embryon péri-éclosion au moment de la migration des cellules germinales primordiales endogènes (Yoshizaki et al., 2002, 2011). Cette technique d'abord utilisée avec succès pour la transplantation de CGPs de truite arc-en-ciel (Takeuchi et al., 2003, 2004) a ensuite été testée en utilisant des populations de spermatogonies adultes contenant des SSCs (Okutsu et al., 2006). Cette expérience a permis de montrer une colonisation des SSCs dans la gonade du receveur ainsi que leur participation à la spermatogenèse ainsi qu'à l'ovogenèse chez les femelles. Enfin, une autre méthode a aussi été développée, et qui serait plutôt le pendant des techniques utilisées chez les mammifères : la transplantation chez l'adulte. Lacerda et al (2008) ont transplanté des spermatogonies via la papille uro-génitale du receveur chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) (Lacerda et al., 2008). La population de cellules injectées a pu être suivie à court terme au sein du testicule du receveur via le marquage membranaire fluorescent PKH26. La transplantation chez l'adulte a aussi été réussie chez d'autres espèces de poissons telles que le pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (Majhi et al., 2009) et le poisson-zèbre (Nóbrega et al., 2010).

Bien que les spermatogonies peuvent recoloniser un testicule normal, l'efficacité de la transplantation dépend directement de la compétition entre les spermatogonies transplantées et les spermatogonies endogènes du récipient pour l'occupation des niches au sein des tubes séminifères (Brinster et al., 2003; Shinohara et al., 2002). A l'inverse, si la spermatogenèse endogène est déplétée, le testicule est alors en conditions pathologiques, et les mécanismes et les cellules sollicitées pour la reconstitution d'une spermatogenèse fonctionnelle pourraient être différents de ceux impliqués chez un testicule en conditions physiologiques normales. Plusieurs techniques permettent de dépletter la spermatogenèse endogène notamment par des traitements aux hautes températures, à l'utilisation du busulfan ou de l'irradiation. Bien que l'irradiation semble la technique qui induit le moins d'effets systémiques, elle est privilégiée pour les mammifères (Creemers et al., 2002; Honaramooz et al., 2005). Chez les poissons, cette technique semble inapplicable du fait de la position interne des testicules en proximité directe avec les organes vitaux.



---

Enfin, une caractéristique importante et avantageuse chez les poissons concerne la biologie du système immunitaire. Celui-ci se met tardivement en place chez l'embryon. Et de plus, il n'existe pas de vraie barrière hémato-testiculaire au sein du testicule (Li and Leatherland, 2012). De ce fait, le taux de réussite élevé de la transplantation chez les poissons ainsi que la facilité de manipulation en font d'excellents modèles pour ce test fonctionnel.

### 3.2.2. *Phénotype « Side population », efflux du hoechst 33342*

Dans plusieurs lignées tissulaires, hématopoïétiques (Goodell et al., 1996), musculaires (Jackson et al., 1999) et neurales (Hulspas and Quesenberry, 2000), les cellules souches partagent un phénotype basé sur l'efflux du colorant fluorescent vital. L'utilisation du colorant de l'ADN, le Hoechst 33342 (Ho) couplé à des analyses de cytométrie en flux a permis de révéler une population cellulaire avec une faible fluorescence pour ce colorant Ho et fortement enrichie en cellules souches, la 'Side Population' (SP). Plusieurs membres de la famille des transporteurs ABC (MDR1, BCRP1/ABCG2) contribuent à l'efflux de ce colorant pour le phénotype SP (Bunting, 2002; Gottesman et al., 2002). Les souris KO pour BCRP1 ont permis de confirmer l'importance de cette protéine dans l'efflux du Hoechst au moins pour les cellules souches hématopoïétiques (Zhou et al., 2002). La présence d'une population SP au sein des cellules germinales a été montrée par l'équipe de Lassalle *et al.* en 2004 (Lassalle et al., 2004). Les cellules de la SP isolées par FACS ont pu recoloniser la gonade et participer à la spermatogenèse endogène après transplantation, indiquant bien que cette population est enrichie en cellules souches spermatogoniales. Ce point est aussi source de conflit puisque plusieurs équipes affirment ne pas enrichir la population en SSCs via l'expression du phénotype side population (Kubota et al., 2003; Shinohara et al., 2011).

### 3.2.3. *« Label Retaining Cells », reflet de la faible prolifération des SSCs in vivo*

Dans le but d'identifier des cellules qui retiennent le marquage (LRC pour Label Retaining Cells), une population cellulaire est marquée irréversiblement pour une période prolongée (pulse), suivit d'une période de « rinçage » (chasse) encore plus long. Si les cellules souches sont marquées, le marquage va perdurer des mois, voire des années, suivant le traitement dans les cellules du fait de leur auto-renouvellement lent (Potten and Hendry, 1975). De plus, le marquage va aussi être détecté de manière transitoire dans des cellules différenciées issues de la division de la cellule souche mère marquée. Autrement dit, le marquage d'une cellule souche va se maintenir tout au long de la vie de l'individu et produire des cellules filles marquées. Un progéniteur sera marqué provisoirement et ce marquage ne va pas se maintenir toute la vie de



---

l'animal puisque ces cellules ont un pouvoir d'auto-renouvellement limité. On parle de marquage clonal. De nombreuses études utilisant cette méthode ont permis d'identifier les populations de cellules souches adultes de tissus divers (Clarke et al., 2003; Duvill   et al., 2003; Morris and Potten, 1999). Le marquage peut consister en un marquage de l'ADN en réplication par l'administration de thymidine tritiée ou de BrdU mais aussi un marquage fluorescent grâce au système Cre-Lox qui permet de recombinaison un transgène spécifique dans un type cellulaire précis suite à un traitement chimique (tamoxifen) (Buckingham and Meilhac, 2011). L'utilisation de tels systèmes fluorescents associés à l'imagerie en temps réel permet aussi de suivre à moyen terme le lignage cellulaire. En effet, cela permet de suivre la descendance complète d'une cellule, les changements morphologiques ainsi que la mort cellulaire.

En 1971, une expérience chez le rat a montré qu'il existait une population de spermatogonies avec un faible taux de prolifération (retenant la thymidine tritiée) (Huckins, 1971). Ces cellules n'ont pas proliféré pendant au moins un cycle de spermatog  nese (13 jours), ce qui permet donc de supposer que ce sont des SSCs quiescentes. Cependant le marquage est perdu lors d'un deuxième cycle de spermatog  nese. Plus tard, en utilisant des souris Ngn3/crER, l'équipe de Yoshida a suivi la destinée des spermatogonies indifférenciées (Nakagawa et al., 2007, 2010). Ils ont ainsi distingué des « Actual stem cells », les cellules progénitrices qui ne s'auto-renouvellent pas ou peu et sont le support de la production des spermatozo  ides ainsi que les « Potential stem cells », les vraies cellules souches qui gardent le marquage pendant plusieurs mois. Grâce à l'imagerie en temps réel, ils ont pu observer des cellules considérées comme engagées dans la voie de différenciation (Apr et Aal) se fragmenter comme décrit chez la drosophile (Brawley and Matunis, 2004). Une expérience de pulse-chase avec du BrdU a permis de mettre en évidence la présence de « Label retaining spermatogonia » dans le testicule de poisson-zèbre (Nóbrega et al., 2010). Plus précisément, après 25 jours de chasse, certaines cellules Aund\* possédaient toujours le marquage tandis qu'au bout de 18 jours de chasse, plus aucune Aund n'était BrdU positive. La population de Aund\* inclurait donc la population de spermatogonies souches chez le poisson-zèbre. Il est intéressant aussi de noter que chez un autre poisson téléostéen, le médaka, l'expérience de pulse-chase au BrdU a permis de mettre en évidence la présence de deux populations d'ovogonies souches, une avec une division rapide, l'autre lente (Nakamura et al., 2010).



---

#### 3.2.4. Clonogénicité *in vitro*, reflet de l'auto-renouvellement des SSCs

Après avoir trié une population enrichie en SSCs, ces cellules sont mises en culture et on teste leur clonogénicité, c'est-à-dire leur capacité à se multiplier et former des colonies qui retiennent des caractéristiques souches. Dans ce test, les cellules sont mises en culture à faible densité. Les cellules sont donc bien isolées les unes des autres ce qui fait que leurs descendances respectives (formation de colonies) sont bien séparées. Le caractère souche de la descendance est vérifié en combinant l'utilisation de marqueurs et de tests fonctionnels comme la transplantation. Ce système *in vitro* permet d'analyser l'impact direct de facteurs de croissance sur la survie et la prolifération des cellules souche hématopoïétiques (Borge et al., 1997; Terstappen et al., 1991) ou de leur différenciation cellulaire (Brummendorf et al., 1998). Par exemple l'équipe de Barroca *et al.* (2009) a ensemencé à très faible densité des puits de culture (500 à 2000 cellules/puits dans une plaque 96 puits) (Barroca et al., 2009). Ce mode de culture leur a permis d'observer et de compter bien distinctement la formation de colonies (germ cell clump) qui reflètent la présence de cellules souches à l'origine. Cependant, les conditions de culture *in vitro* ne permettent pas de reproduire totalement les paramètres de la niche *in vivo* dont les interactions physiques et moléculaires des cellules souches avec leur microenvironnement qui régule leur devenir et peuvent donc entraîner des mauvaises interprétations du fait du caractère souche ou progéniteur de la cellule.

#### 3.2.5. Une activité alcaline phosphatase

L'alcaline phosphatase est un marqueur des cellules souches pluripotentes embryonnaires (O'Connor et al., 2008). Plusieurs études ont permis de montrer qu'en culture, les SSCs ont une activité alcaline phosphatase chez la souris (Kubota et al., 2004), le lapin (Kubota et al., 2011) ainsi que chez le médaka (Hong et al., 2004) même si cela ne semble pas vrai pour toutes les espèces de vertébrés comme chez le poulet (Jung et al., 2007). Pourtant cette propriété n'est généralement pas admise pour les SSCs *in vivo* où l'activité alcaline phosphatase est forte dans les CGPs, mais est perdue lors de l'évolution vers le stade gonocyte (Cooke et al., 1993; Richards et al., 1999).

### 3.3. Des gènes spécifiquement exprimés

C'est l'ensemble d'expression de marqueurs qui permettent de caractériser ces cellules et de traduire leurs engagements plus ou moins prononcés dans la voie de différenciation (Shinohara et al., 2000a). Cet aspect est une caractéristique retrouvée dans d'autres systèmes souches, tels



---

que les cellules souches hématopoïétiques de souris qui sont CKIT<sup>+</sup> SCA1<sup>+</sup> FLT3<sup>-</sup> (Wilson and Trumpp, 2006). Actuellement, aucun marqueur unique et spécifique des spermatogonies souches n'est identifié quelle que soit l'espèce. Toutefois, ID4 qui est exprimé spécifiquement par les As de souris, considérées comme les spermatogonies les plus indifférenciées, est proposé comme marqueur distinctif des SSCs chez cette espèce (Oatley et al., 2011).

### 3.3.1. Des protéines membranaires, un outil de tri des SSCs

Trois stratégies ont permis d'identifier des marqueurs potentiels de SSCs : la recherche des molécules d'adhésion, l'identification de marqueurs communs avec d'autres types de cellules souches, l'analyse des profils d'expression de récepteurs de facteurs régulant la destinée des SSCs.

Dans l'étude conduite par Shinohara et al (1999), une forte adhésion des SSCs à la laminine de la matrice extracellulaire de la lame basale a abouti à l'identification d'**alpha6 et beta1 INTEGRINES** comme des marqueurs de surface des SSCs (Shinohara et al., 1999). Dans cette étude, les populations cellulaires exprimant ces molécules ont été isolées grâce à une technique de tri magnétique (MACS) suivie de la transplantation dans le testicule de souris stériles adultes. Les résultats ont permis de montrer que les cellules triées sur b1 ou a6 INTEGRINE étaient respectivement 4 et 8 fois enrichies en SSCs. Via l'analyse du phénotype associé au KO de *b1 intégrine* chez la souris, il a été montré que cette molécule est indispensable à la colonisation de la niche par les SSCs (Kanatsu-Shinohara et al., 2008a). En effet, les cellules testiculaires isolées issues de ces animaux produisent significativement moins de colonies que les contrôles après transplantation. De plus, les cellules transplantées restent dans les tubes séminifères au moins 3 semaines mais ne s'attachent jamais à la lame basale. De ce fait, l'intégrine b1 est indispensable au maintien des SSCs à la lame basale. Ces deux intégrines semblent aussi identifier les CGPs de poulet (*Gallus gallus*) (Jung et al., 2005).

Des études chez la drosophile ont montré que les cadherines sont indispensables pour les interactions niche – cellules souches (Song et al., 2002; Yamashita et al., 2003). Chez la souris, un anticorps dirigé contre l'**E-CADHERINE (CDH1)** pour bloquer son action, entraîne un défaut de migration et de concentration des cellules germinales primordiales dans les crêtes génitales (Bendel-Stenzel et al., 2000; Okamura et al., 2003). L'expression de l'E-CADHERINE semble restreinte aux spermatogonies indifférenciées chez la souris adulte (Tokuda et al., 2007; Wu et al., 1993). Cependant, les spermatogonies isolées de souris KO pour le gène codant l'*E-cadherine* ne montrent pas de défaut de colonisation de la niche et de



---

leur maintien après transplantation. Ce qui laisse tout de même supposer que l'E-CADHERINE n'est pas indispensable pour les SSCs à la différence des CGPs (Kanatsu-Shinohara et al., 2008a). D'autres cadherines sont présentes sur d'autres types de cellules souches, ce qui pourrait donc expliquer une compensation pour le défaut d'E-CADHERINE.

**EPCAM**, une autre molécule d'adhésion, est essentielle pour les cellules souches embryonnaires (González et al., 2009) et est exprimée par la lignée germinale pendant tout le développement embryonnaire (Anderson et al., 1999). EPCAM semble être un marqueur intéressant des SSCs chez le rat (1 SSC sur 9 cellules) (Ryu et al., 2004) tandis que chez la souris son expression est relativement faible dans la population de spermatogonies A indifférenciée et augmente dans les cellules progénitrices (Kanatsu-Shinohara et al., 2011).

Pour purifier encore plus finement la population de SSCs parmi la population de cellules germinales, Kubota et al (2003) ont listé les marqueurs exprimés par les cellules souches hématopoïétiques (Kubota et al., 2003). En se basant sur l'idée que des types souches différents expriment les mêmes marqueurs cellulaires, ils ont pu identifier l'expression de **THY1 (CD90)** par les SSCs de souris. Ces études ont permis de montrer que presque toutes les SSCs (environ 95%) étaient présentes dans la fraction THY1+, qui compte une concentration de 1 SSC sur 15 cellules, d'après les analyses de transplantation. Dans le testicule de souris adulte, la fraction cellulaire THY1+ est enrichie environ 30 fois en comparaison de la fraction non triée.

En se basant sur la même hypothèse, Kanatsu-Shinohara et al (2004) ont montré que les SSCs de souris expriment **CD9** tout comme les cellules souches embryonnaires (Oka et al., 2002), les cellules souches neurales (Klassen et al., 2001) et les cellules souches hématopoïétiques (Oritani et al., 1996). Les analyses des résultats de transplantation ont montré que les cellules testiculaires CD9+ étaient enrichies en SSCs (5 à 7 fois plus) en comparaison de la population testiculaire totale issue d'une souris ou d'un rat adulte (Kanatsu-Shinohara et al., 2004).

Au contraire de l'expression conservée de THY1 et de CD9 par rapport aux cellules souches hématopoïétiques, les SSCs n'ont pas une expression forte de **C-KIT** pourtant caractéristique des HSCs (Kanatsu-Shinohara et al., 2004; Kubota et al., 2003; Matsui et al., 1990) indiquant donc que les marqueurs de surface ne sont pas tous identiques entre les populations de cellules souches. Pourtant C-kit apparait indispensable à plusieurs niveaux au sein des cellules germinales. C-KIT est exprimé par les CGPs afin de répondre aux signaux KIT LIGAND (ou SCF pour Stem Cell Factor) émis par les cellules somatiques, guidant ainsi la prolifération et la migration des CGPs lors du développement embryonnaire (Gu et al., 2009; Manova and



---

Bachvarova, 1991; Matsui et al., 1990; Orr-Urtreger et al., 1990; Runyan et al., 2006). De même que pour la migration des CGPs, la voie C-KIT/KIT LIGAND est indispensable à la migration des gonocytes de la lumière du tube séminifère à la lame basale (Ohbo et al., 2003; Orth et al., 1997). Avec la transition en spermatogonies des gonocytes, l'expression de C-KIT est nettement réduite. Puis, chez l'adulte, tandis que le transcrit est détecté à faible niveau dans les spermatogonies indifférenciées, l'expression de la protéine elle, est associée avec la différenciation des spermatogonies (Prabhu et al., 2006; Shinohara et al., 2000b). De plus, il semblerait que d'autres types cellulaires au sein du testicule expriment C-KIT tels que les cellules de Leydig. Il serait impliqué dans leur capacité stéroïdogénique et leur survie (Prabhu et al., 2006; Rothschild et al., 2003; Yan et al., 2000). La prolifération des spermatogonies différenciées est directement associée à l'apparition de l'expression du récepteur C-KIT et de son interaction subséquente avec KITL (Ohta et al., 2000, 2003; Tajima et al., 1994). C-KIT est utilisé couramment pour affiner le tri des spermatogonies souches en éliminant les spermatogonies indifférenciées exprimant ce récepteur. C'est le tri négatif. Enfin, il est intéressant de noter qu'au cours de culture à long terme de SSCs appelées GS pour Germline Stem cells, des cellules de cette population expriment C-KIT, décrit comme marqueur des spermatogonies différenciées et des spermatocytes primaires (Morimoto et al., 2009). Pourtant au sein de cette culture, la population KIT- et KIT+ présentaient les mêmes niveaux d'activité SSCs, et la spermatogenèse a bien eu lieu après transplantation de l'une ou l'autre des populations. L'expression de C-KIT au sein du testicule a aussi été étudiée chez d'autres vertébrés non mammaliens avec un profil d'expression moins restreint dans les spermatogonies. En effet, chez le poulet une population de cellules germinales triées sur l'expression de C-KIT ont été capable de coloniser la gonade et restaurer la spermatogenèse après transplantation dans un testicule rendu stérile (Trefil et al., 2010). Chez la roussette, au niveau transcriptionnel, *c-kit* est détecté dans des spermatogonies indifférenciées de la zone germinative (Bosseboeuf et al., 2014).

GDNF est le facteur régulateur de l'auto-renouvellement des SSCs chez les mammifères. Son action passe par sa fixation à un complexe de récepteur formé d'une molécule à activité tyrosine kinase transmembranaire, **C-RET**, et de **GFRa1**, ancré à la membrane. De ce fait, l'expression de C-RET et/ou de GFRa1 est supposée restreinte aux SSCs dans les testicules mammaliens. La protéine RET est détectée dans les spermatogonies jusque dans les spermatocytes (stade leptotène) (Creemers et al., 2002), mais la transplantation de cellules isolées sur ce marqueur par MACS n'a pas permis d'enrichir une population testiculaire en SSCs (Ebata et al., 2005).



---

**GFRA1** est exprimée par une sous-population de spermatogonies dans le testicule de souris incluant les As, Apr et certaines Aal (Ebata et al., 2005; Naughton et al., 2006). Hofmann et al (2005) ont isolé des cellules GFRA1 positives de souriceaux de 6 jours et n'ont montré aucun enrichissement de la population de SSCs (2,5 fois plus mais non significatif) (Hofmann et al., 2005). Des études ultérieures par Bugeaw et al (2005) testant à nouveau l'isolement de cellules testiculaires GFRA1 positives ont montré un enrichissement relativement faible en SSCs (moins de cinq fois enrichies) à partir de testicules de souriceaux de 10 jours (Bugeaw et al., 2005). Ces études démontrent donc que la fraction cellulaire GFRA1+ est au mieux à peine enrichie en SSCs. Chez des vertébrés non-mammaliens, l'expression de *Gfra1* est spécifiquement détectée dans la majorité des spermatogonies Aund de tilapia (90%) et spécifiquement dans les spermatogonies de la zone germinative chez la roussette (Bosseboeuf et al., 2014; Santos Nassif Lacerda et al., 2013).

D'autres marqueurs membranaires de SSCs ont été récemment proposés chez les mammifères mais sont beaucoup moins utilisés. Par exemple, les spermatogonies triées sur **GPR125**, cultivées pendant 1 an puis transplantées ont pu recoloniser les tubes séminifères et participer à la spermatogenèse chez un individu receveur (Seandel et al., 2007). **CSF1R**, le récepteur de CSF1, fortement exprimé par les spermatogonies A GFRA1 positives, ne semble jamais avoir été testé pour isoler ces cellules et tester leur capacité à reformer la spermatogenèse après transplantation (Kokkinaki et al., 2009; Oatley et al., 2009). Il est aussi intéressant de noter que la protéine CSF1R a été détectée dans plusieurs types de cellules souches/progénitrices, tels que les HSCs (Bartelmez and Stanley, 1985), les progéniteurs des phagocytes mononucléaires (Tushinski et al., 1982), et les monoblastes (Byrne et al., 1981).

D'autres marqueurs membranaires de cellules germinales indifférenciées sont décrits dans la littérature non-mammalienne. **SSEA1** et **EMA1** identifient les cellules souches embryonnaires de poulet ainsi que les cellules germinales primordiales (Pain et al., 1996; Urven et al., 1988). Chez la truite arc-en-ciel, deux études ont été menées afin d'identifier un marqueur spécifique des spermatogonies précoces dans cette espèce et ont abouti à l'identification de **notch1** et de **ly75** (Nagasawa et al., 2010; Yano et al., 2009). Ces deux marqueurs semblent intéressants mais sont en réalité spécifiques de toutes les spermatogonies A et ne permettront donc pas un enrichissement en SSCs.

Malheureusement, les fractions cellulaires positives pour un ou même plusieurs de ces marqueurs ne permettent pas à ce jour d'obtenir des fractions pures de SSCs.



---

### 3.3.2. Des facteurs de transcription, un outil d'identification *in situ* des SSCs

Outre la présence de marqueurs membranaires des SSCs qui présentent l'avantage de pouvoir trier ces cellules via des technologies simples basées sur la liaison antigène-anticorps (MACS et FACS), les SSCs sont aussi identifiables *in situ* ou par le biais d'utilisation de techniques de transgénèse ciblant des protéines intracellulaires. Nombre de ces protéines ont un rôle crucial dans le contrôle de la biologie des cellules spermatogoniales souches.

Des modèles d'inactivation de gènes par KO ont permis de démontrer l'importance de plusieurs gènes dans le fonctionnement des SSCs. Des souris mâles porteuses de la mutation *luxoid* (*lu*) sont sub-fertiles et présentent des anomalies dans la formation du sperme. L'infertilité progressive est provoquée par la perte graduelle des SSCs (Buaas et al., 2004). La mutation affecte le locus *Zfp145* codant pour le répresseur de transcription **PLZF** (promyelocytic leukaemia zinc-finger). De même, la perturbation ciblée de *Zfp145* induit un phénotype testiculaire semblable au mutant *luxoid* (Costoya et al., 2004). Chez ces mutants, le pourcentage de spermatogonies différenciées est plus élevé par rapport au type sauvage. Enfin, les cellules testiculaires isolées de ces mutants n'arrivent pas à reconstituer une spermatogenèse dans les souris receveuses. Dans le testicule, l'expression de PLZF est restreinte aux spermatogonies A indifférenciées As à Aal (Costoya et al., 2004). Toutes ces informations supportent le rôle de PLZF dans le maintien de l'auto-renouvellement des SSCs et son opposition à leur différenciation. Un rôle possible de PLZF dans les spermatogonies pourrait être le maintien de l'état indifférencié en régulant leur état épigénétique (Filipponi et al., 2007), semblable au rôle proposé de PLZF dans les cellules progénitrices hématopoïétiques (Reid et al., 1995). De même, il a été montré que PLZF réprime l'expression du marqueur de différenciation spermatogonial, C-KIT (Filipponi et al., 2007). L'expression de l'hétérologue de *plzf* chez le poisson-zèbre est détecté dans les spermatogonies A jusqu'au cyste de huit spermatogonies (Ozaki et al., 2011). Une étude récente conduite chez la roussette montre l'expression de *plzf* dans les spermatogonies indifférenciées, expression qui décroît progressivement jusqu'à la différenciation en spermatides (Bosseboeuf et al., 2014).

**OCT4, NANOG, SOX2 et LIN28** sont d'autres marqueurs intrinsèques qui peuvent réguler la pluripotence des cellules souches mais dont un rôle crucial a aussi été démontré dans le maintien et la prolifération des spermatogonies souches notamment au sein du testicule humain (Gillis et al., 2011; Kerr et al., 2008). Plusieurs de ces facteurs sont aussi exprimés par les cellules somatiques (Wu et al., 2010), à l'exception de LIN28. Des études récentes ont montré que lorsque les spermatogonies rentrent en différenciation sous l'influence de l'acide rétinoïque,



---

l'expression de LIN28 est réprimée. Dann et al (2008) ont permis de démontrer que la répression de l'expression de OCT4 (POU5F1) par du shRNA en culture a diminué l'efficacité de colonisation du testicule après transplantation (Dann et al., 2008). De plus, dans le testicule, l'expression de PLZF est restreinte aux spermatogonies A indifférenciées As à Aal et PLZF est co-exprimé avec OCT4 (Buaas et al., 2004). L'homologue téléostéen d'OCT4 est *pou2*. Chez le médaka, il est exprimé fortement dans les ovocytes et dans les CGPs mais aussi détecté un peu plus faiblement dans les spermatogonies A précoces situées en extrémité du testicule (Sánchez-Sánchez et al., 2010). Chez la roussette, ce marqueur *pou2* identifie la population de cellules spermatogoniales indifférenciées de la zone germinative spécifiquement (Bosseboeuf et al., 2014).

**SALL4** (Spalt-like 4) est un facteur de transcription en doigt de zinc exprimé par les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste et co-exprimé avec OCT4 et SOX2 (Elling et al., 2006). *In vitro*, SALL4 stimule la prolifération des cellules souches embryonnaires (ES) (Sakaki-Yumoto et al., 2006) et permet le maintien de la pluripotence en réprimant la différenciation du trophoctoderme (Yuri et al., 2009), probablement en se liant au promoteur proximal d'OCT4 (Zhang et al., 2006) et en interagissant avec NANOG (Wu et al., 2006). De ce fait, SALL4 est un important facteur des cellules souches, et avec OCT4, SOX2, et NANOG constituent une voie de régulation de transcription importante pour la pluripotence des cellules souches (Lim et al., 2008; Yang et al., 2008). Un co-marquage avec PLZF et GFRA1 a permis de préciser l'expression de SALL4 dans les spermatogonies As à Aal (Gassei and Orwig, 2013). Ces résultats reflètent aussi l'hétérogénéité des spermatogonies puisque parmi les spermatogonies A indifférenciées (dont les As), certaines cellules sont SALL4+ GFRA1-.

Chez la drosophile, l'expression de **NANOS** est nécessaire pour la migration des cellules germinales primordiales dans la gonade et pour leurs fonctionnalités (Forbes and Lehmann, 1998; Kobayashi et al., 1996). Dans l'ovaire adulte, NANOS est exprimé par les OSCs et régule leur auto-renouvellement en inhibant l'expression des gènes favorisant la différenciation des OSCs en ovocytes (Gilboa et al., 2003; Wang and Lin, 2004). Via l'interaction avec PUMILIO, NANOS se lie à des éléments de réponse à NANOS (NRE) portés par des transcrits afin de réprimer leur traduction (Asaoka-Taguchi et al., 1999; Forbes and Lehmann, 1998; Gupta et al., 2009; Sonoda and Wharton, 1999). Chez la souris, trois homologues de NANOS ont été identifiés, NANOS1, 2 et 3, mais seulement NANOS2 et NANOS3 sont détectés dans les gonades. Les souris KO pour *nanos2* ont une absence totale de cellules germinales dans le testicule tandis qu'aucun effet n'est détecté dans l'ovaire. En revanche, les souris KO pour



---

*nanos3* sont caractérisées par une absence totale de cellules germinales dans les deux sexes (Tsuda et al., 2003). En effet, dans la gonade en développement, NANOS3 est détectée dans les CGPs jusque 14,5 jpc dans la gonade mâle et jusque 13,5 jpc dans la gonade femelle. Son expression disparaît ensuite pour être à nouveau détectée après la naissance uniquement dans quelques spermatogonies (Apr à Aal) (Sada et al., 2009; Suzuki et al., 2007; Tsuda et al., 2003). Au contraire, NANOS2 est spécifiquement réprimé dans l'ovaire et est détecté dans une population de spermatogonies As et Apr du testicule adulte. L'étude approfondie du rôle de NANOS2 dans ces cellules montre que sa répression de l'expression de gènes passe par leur dégradation via le complexe CCR4-NOT (Suzuki et al., 2010). De même, chez le poisson-zèbre, les orthologues de Nanos régulent la survie des CGPs (Köprunner et al., 2001) au cours de l'embryogenèse précoce et sont nécessaires pour maintenir la production d'ovocytes chez l'adulte (Draper et al., 2007). Il est intéressant de remarquer deux études montrent une expression spécifique de *nanos2* dans les ovogonies souches chez le médaka (Nakamura et al., 2010) ainsi que dans les ovogonies souches chez le poisson-zèbre (Beer and Draper, 2013).

Une étude récente montre que **ID4**, un répresseur de transcription, est exprimé par une sous-population de spermatogonies indifférenciées et marque sélectivement les As (Oatley et al., 2011). De plus, l'expression de ID4 est stimulée par GDNF, et pour les souris KO pour ID4, on observe une perte progressive de la population de spermatogonies A indifférenciées au cours de la vie de l'individu. En culture, lorsque l'expression d'ID4 est diminuée via des RNAi, l'expansion des SSCs est réduite. De par son expression limitée à quelques As, ID4 apparaît donc comme un marqueur fort et spécifique des spermatogonies souches au sein des spermatogonies indifférenciées.

Enfin, une étude cherchant à caractériser les gènes cibles de GDNF (facteur régulant l'auto-renouvellement des SSCs) au sein des spermatogonies, a permis l'identification de trois facteurs de transcription spécifiquement up-régulés : **BCL6B**, **ERM (ou ETV5)** et **LHX1**. L'inhibition de l'expression de ces gènes *in vitro* par des siARNs spécifiques a permis de confirmer leurs rôles dans l'auto-renouvellement des SSCs (Oatley et al., 2006, 2007). Une diminution de la formation des amas de SSCs en culture ainsi que de la colonisation des testicules après transplantation ont été observées. Il est intéressant de noter tout de même que les souris KO pour *bcl6b* sont fertiles (Oatley et al., 2006) et présentent des dérèglements légers de la spermatogenèse suggérant donc que d'autres gènes peuvent compenser la perte d'expression de *bcl6b*. Ces trois molécules sont des facteurs de transcription et jouent un rôle dans la fonction d'autres systèmes cellulaires. La dérégulation de BCL6B chez la souris induit une diminution



---

de la prolifération des lymphocytes T (Manders et al., 2005), la suppression de l'expression d'ETV5 affecte la croissance et le développement de l'organisme (Liu et al., 2003; Schlessner et al., 2008; Yang et al., 2003), et l'inactivation de *Lhx1* induit la répression de la morphogénèse de la gonade et une létalité néo-natale (Kobayashi et al., 2005; Shawlot and Behringer, 1995). Les souris KO pour *etv5* présentent un phénotype sévère affectant la spermatogénèse (Chen et al., 2005). Ce KO induit un défaut dans le maintien du pool de SSCs tandis que la différenciation des spermatogonies ne semble pas être affectée. ETV5 est exprimé à la fois par les spermatogonies et les cellules de Sertoli, et ces expressions particulières semblent toutes deux indispensables à la spermatogénèse. ETV5 serait directement impliqué dans la régulation de BCL6B (Wu et al., 2011). Collectivement ces observations indiquent qu'ETV5 pourrait avoir plusieurs rôles pour réguler la fonction des SSCs, intrinsèquement en régulant l'expression spécifique d'un réseau de gènes, et extrinsèquement en influençant les facteurs sécrétés dans la niche par les cellules de Sertoli. Au contraire, les expressions respectives de BCL6B et de LHX1 ont seulement été détectées dans des spermatogonies isolées, suggérant donc une fonction germinale spécifique (Oatley et al., 2007).

L'inactivation de **TAF4b** (TATA Box Binding Protein associated Factor 4b) induit un phénotype dans lequel les mâles deviennent infertiles à trois mois et seules des Sertoli sont observées dans les tubules (Falender et al., 2005). Des SSCs issues de souris de types sauvage transplantées dans ces souris KO pour TAF4b peuvent restaurer une spermatogénèse fonctionnelle confirmant que la spermatogénèse détériorée est bien due à un défaut de cellules germinales.

Des expériences de KO conditionnel chez des souris ont permis de démontrer que la neurogénine 3 (**NGN3**) est exprimée par les spermatogonies les plus précoces (Yoshida et al., 2004) contenant au moins 11% de SSCs transplantables (Nakagawa et al., 2007). Le fait que **NGN3** n'est pas exprimé par toutes les cellules souches transplantables dans cette étude confirme l'hétérogénéité des SSCs. Plus tard, il a été en réalité montré que **NGN3** est exprimé par les spermatogonies en différenciation (Kaucher et al., 2012; Nakagawa et al., 2010; Suzuki et al., 2009). Des études supplémentaires ont permis d'impliquer **STAT3** dans la différenciation des spermatogonies (Oatley et al., 2010). L'inhibition de la signalisation de **STAT3** empêche la différenciation des spermatogonies en induisant une déficience d'expression de **NGN3** (Kaucher et al., 2012). Il est intéressant de noter qu'au sein de chaînes de spermatogonies (Aal) exprimant **NGN3**, certaines cellules sont négatives pour cette protéine impliquant donc que

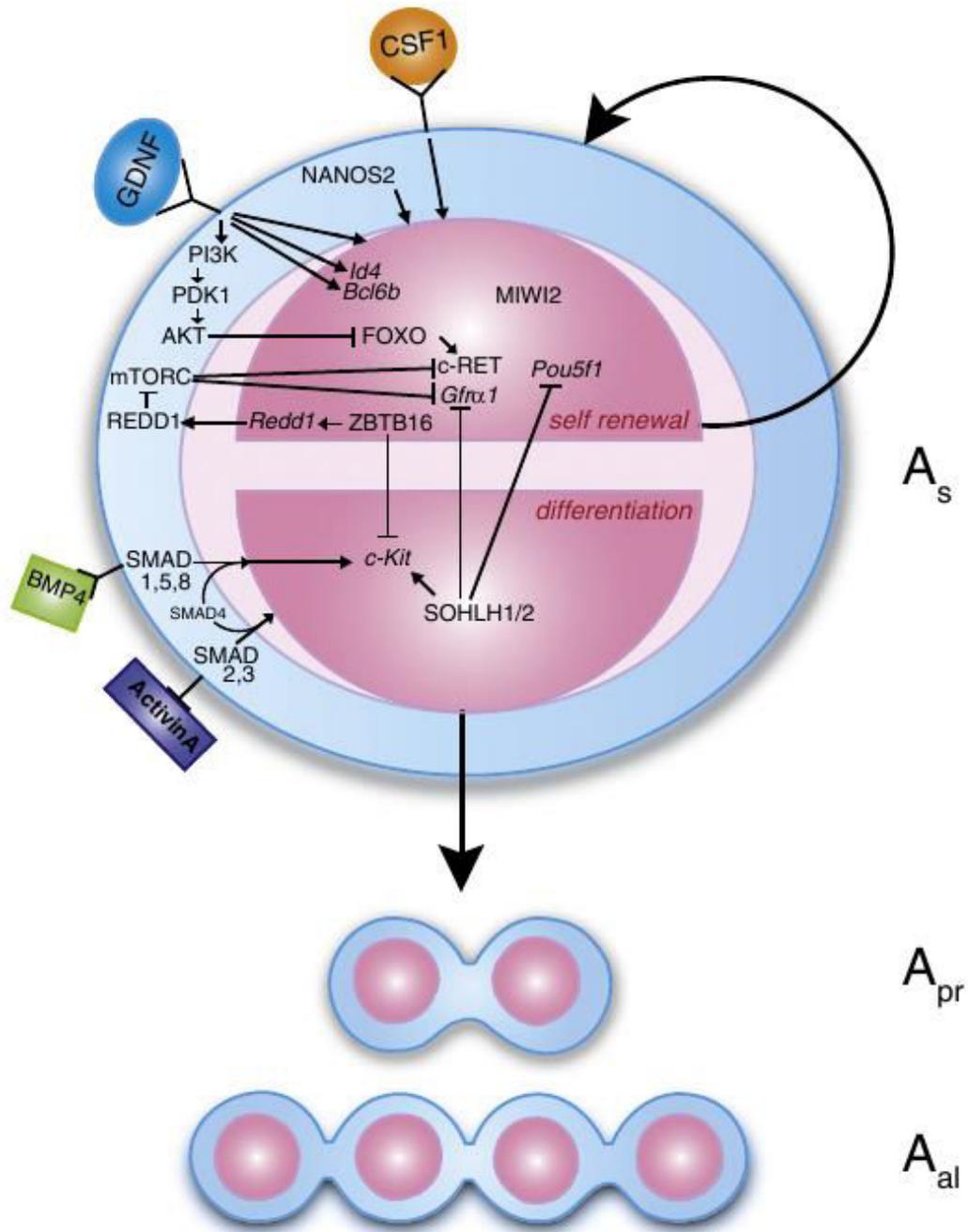


---

parmi les clones de spermatogonies Aal, des cellules sont plus ou moins engagées dans la voie de différenciation (Zheng et al., 2009).

**STRA8** a été premièrement décrit comme un gène régulé par l'acide rétinoïque dans une culture de lignée cellulaire (Oulad-Abdelghani, 1996). A la fois dans l'ovaire et dans le testicule, l'acide rétinoïque est nécessaire et suffisant pour induire l'expression de STRA8 (Koubova et al., 2006; Zhou et al., 2008), tandis que le KO de *stra8* induit l'absence des spermatocytes tardifs ainsi que des spermatides, tandis que les spermatogonies et les spermatocytes au stade pré-leptotène sont présents dans un nombre physiologique normal (Anderson et al., 2008). L'expression de STRA8 est détectée dans les spermatogonies indifférenciées et elle augmente spécifiquement dans les spermatogonies différenciées du fait de son rôle dans la méiose (Zhou et al., 2008).

L'inhibition des facteurs précédemment cités induirait la différenciation des spermatogonies. Deux facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice (helix-loop-helix ; HLH), **SOHLH1** et **SOHLH2** sont essentiels pour la différenciation des spermatogonies. La perte de l'expression de SOHLH1 perturbe la différenciation des spermatogonies en spermatocytes (Ballow et al., 2006), et les souris *sohlh2* KO ont un blocage de leur spermatogenèse et finissent par avoir une dégénérescence des colonies de spermatogonies différenciées (Hao et al., 2008; Toyoda et al., 2009). Récemment, il a été proposé que ces deux gènes répriment l'expression de gènes impliqués dans le maintien des SSCs tel que GFRA1, et induisent l'expression de gènes important pour la différenciation des spermatogonies tels que C-KIT (Suzuki et al., 2012). Cependant SOHLH1 et SOHLH2 peuvent être exprimées à la fois par des spermatogonies C-KIT négatives et C-KIT positives. En effet, SOHLH1 est exprimée par les spermatogonies Aal, A1-A4, intermédiaires et les spermatogonies B (Ballow et al., 2006) tandis que SOLHLH2 est exprimé par toutes les spermatogonies (As-Aal et A1-A4), et est absente des spermatogonies B (Toyoda et al., 2009). Ils sont donc au moins co-exprimés dans une sous-population de spermatogonies indifférenciées et seraient impliqués dans la répression des gènes ayant un rôle dans l'auto-renouvellement des SSCs (Suzuki et al., 2012).



**Figure 11 : Acteurs moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement et la différenciation des spermatogonies souches chez la souris.**

Issu de *Jan et al., 2012.*

---

## 4. Régulation du devenir des cellules spermatogoniales souches

Chez la drosophile, les mécanismes de régulation du devenir des cellules spermatogoniales souches dépend de la sécrétion par les cellules somatiques adjacentes des SSCs de plusieurs facteurs de croissance spécifiques. Une de ces protéines, est la cytokine-like Unpaired (UPD) qui assure l'auto-renouvellement des cellules souches maintenues dans le hub (Kiger et al., 2000; Li and Xie, 2005; Tulina and Matunis, 2001). UPD active ensuite la voie Janus Kinase (JAK-STAT) au sein des cellules souches pour spécifier leur auto-renouvellement. Bien que les voies de régulation n'apparaissent pas conservées avec les vertébrés, la niche germinale garde toujours un rôle important dans le contrôle de la balance entre auto-renouvellement et différenciation des cellules souches. Ces régulations peuvent être de trois ordres : des facteurs intrinsèques à la SSCs, des facteurs sécrétés par les cellules somatiques environnantes, des régulations hormonales.

### 4.1. Facteurs endogènes au SSCs

#### 4.1.1. Marqueurs de SSCs et acteurs dans leurs régulations

Plusieurs gènes identifiés dans un premier temps pour leur expression spécifique dans les SSCs/spermatogonies indifférenciées ont un rôle démontré et étudié dans le maintien de l'état souches des SSCs. Ces rôles ont déjà été évoqué dans la section précédente. Certains sont représentés dans la figure 11, figure issu d'une revue de (Jan et al., 2012).

#### 4.1.2. Piwi et les petits ARNs, gardiens des SSCs

Les petits ARNs (microARNs, les petits ARN interférents et les ARNs interagissant avec Piwi) agissent au niveau post-transcriptionnel ou chromatinien (épigénétique) (Ghildiyal and Zamore, 2009). Leur action est médiée grâce aux protéines ARGONAUTES qui les guident jusque leurs cibles (Hammond et al., 2001; Liu et al., 2004). L'analyse phylogénétique distingue clairement deux sous-familles de protéines Argonaute : AGO et PIWI (Höck and Meister, 2008). Tandis que les protéines AGO sont exprimées de façon ubiquitaire et lient les miARNs et siARNs, les protéines de la sous-famille PIWI lient les piARNs et présentent des profils d'expression plus restreints qui incluent la lignée germinale et les cellules souches adultes (Juliano et al., 2011). De plus, tandis que les miARNs sont bien conservés entre espèces et présentent une diversité limitée, une seule espèce possède des centaines de milliers de séquences de piARNs, qui ne semblent pas conservées entre espèces.



---

Il y a plus de 15 ans, un screen génétique pour trouver des mutants affectant la division asymétrique des cellules germinales chez la drosophile a permis d'identifier le premier gène PIWI (Lin and Spradling, 1997). La perte de PIWI dans les cellules souches de lignée germinale réduit le taux de division tandis que sa surexpression augmente la vitesse de divisions des cellules souches (Cox et al., 1998, 2000). La souris possède trois gènes PIWI : MILI, MIWI, et MIWI2 tous essentiels pour la spermatogenèse (Deng and Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004). En particulier, le KO de MIWI2 entraîne la perte progressive des cellules germinales (Carmell et al., 2007). Les homologues *ziwi* et *zili* chez le poisson-zèbre sont aussi impliqués dans le maintien des cellules germinales. En particulier, leur KO entraîne une apoptose massive conduisant à l'absence totale de cellules germinales à 40 jours (Houwing et al., 2007, 2008)(Houwing et al., 2007, 2008).

Ces observations impliquent une conservation entre espèces phylogénétiquement distinctes du rôle de certains membres de la famille PIWI dans le maintien des cellules germinales souches. L'hypothèse largement acceptée est que la voie PIWI/piARNs réprime l'expression des transposons dans la lignée germinale pour protéger l'intégrité du génome (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007). En effet, en absence de protéine PIWI chez la drosophile, les niveaux de transposons augmentent (Reiss et al., 2004; Sarot et al., 2004; Savitsky et al., 2006). Les éléments transposables sont des fragments génétiques mobiles qui sont capables de s'auto-propager et s'insérer dans le génome, provoquant ainsi des mutations s'ils s'insèrent dans des séquences codantes. De plus, au vu des défauts entraînés par les KO des gènes *piwi*, une part de leurs fonctions semble aussi étroitement liée à la répression de l'apoptose.

Les protéines PIWI sont localisées dans les granules germinaux (nuage et corps chromatiniens) (Kotaja and Sassone-Corsi, 2007) ; cette structure semble donc le lieu d'action des piARNs pour la défense du génome contre l'insertion de transposons. Les granules germinaux sont composés à la fois d'ARNs et de protéines (Arkov and Ramos, 2010; Schisa, 2012; Voronina et al., 2011) et observés dans la lignée germinale de nombreuses espèces (Eddy, 1975). Les granules germinaux présents dans l'ovocyte – œufs d'espèces dont le déterminisme de la lignée germinale est transmis au niveau maternel – sont appelés plasma germinal (Saffman and Lasko, 1999; Seydoux and Braun, 2006; Strome and Lehmann, 2007). Bien que chez les mammifères, la lignée germinale ne dépend pas du plasma germinal initial mais est formée par épigenèse au cours du développement embryonnaire (McLaren, 2003), les granules germinaux sont détectés dans les cellules germinales testiculaires et ovocytaires (Chuma et al., 2009; Eddy, 1975). Les granules germinaux sont présents sous différentes formes au sein des cellules germinales. On



---

distingue le nuage (ou ciment lorsqu'il est associé à des mitochondries) dans les gonocytes, spermatogonies et spermatocytes primaires chez le mâle, et dans les ovocytes chez la femelle, et le corps chromatinien, plus gros et observable dans les spermatocytes secondaires et spermatides. Le rôle de cette structure est resté longtemps inconnu. En plus de PIWI, d'autres protéines sont détectées au sein de ces granules germinaux : TDRD1 ; MVH ; (Aravin et al., 2009; Chuma et al., 2003).

Des données récentes suggèrent que, comme dans les cellules ES et les cellules souches somatiques, la voie des miARNs a un rôle essentiel dans la spécification des CGPs et le maintien des cellules souches de la lignée germinale (Förstemann et al., 2005; Megosh et al., 2006; Park et al., 2007). Les niveaux d'expression de miARNs sont élevés dans les CGPs, les cellules germinales et les cellules souches de la lignée germinale, par rapport aux cellules somatiques (Buchold et al., 2010). Grâce à outils transcriptomiques, des miARNs exclusivement ou préférentiellement exprimés dans des types germinaux distincts ont été identifiés (Buchold et al., 2010; Marcon et al., 2008; McIver et al., 2012; Papaioannou and Nef, 2010).

miR- 146 est fortement exprimé dans les spermatogonies indifférenciées et semble impliqué dans le contrôle de la différenciation induite par l'acide rétinoïque chez la souris (Huszar and Payne, 2013). miR -221 et miR- 222 sont d'autres miARNs proposés comme impliqués dans la régulation de la différenciation des spermatogonies. Grâce aux séquençages à hauts débits, miR-21, ainsi que miR-34c, -182, -183, et -146a, ont été identifiés comme étant préférentiellement exprimés dans une population de cellules spermatogoniales enrichies en SSCs. L'inhibition transitoire de miR-21 dans des cultures de cellules germinales souches enrichies en SSCs provoque l'augmentation du nombre de cellules germinales en apoptose. Il apparaît donc comme important dans le maintien des SSCs. Chez la souris, l'expression de miR-141, -200a, -200c et -323 diminuent progressivement dans les cellules germinales mâles et femelles au cours de leur développement (Hayashi et al., 2008). Les miARNs sont aussi impliqués dans la régulation de plusieurs gènes de pluripotence nécessaires pour la spécification des cellules germinales. Par exemple, miR-145 réprime l'expression d'OCT4 et de SOX2 dans les cellules souches embryonnaires humaines (ES) favorisant ainsi leur différenciation (Xu et al., 2009). En outre NANOG, SOX2 et OCT4 sont régulés par miR-134, 296 et 470 dans des cellules ES (Tay et al., 2008). Cependant, les cibles des miARNs restent largement inconnues.

Une étude récente menée sur la caractérisation des profils d'expression des miARNs de truite arc-en-ciel au cours du développement ovarien vient d'être publiée (Juanchich et al., 2013).



---

## 4.2. Des facteurs paracrines sécrétés par les cellules somatiques de la niche

### 4.2.1. *Gdnf*, important stimulateur de l'auto-renouvellement des SSCs

Chez les mammifères, GDNF est le facteur majeur responsable du maintien et de l'auto-renouvellement des cellules spermatogoniales souches *in vivo* et *in vitro* (Hofmann et al., 2005; Kubota et al., 2004; Meng et al., 2000). Originellement ce facteur a été identifié dans des cultures de lignées cellulaires de gliome (Lin et al., 1993). Plus tard, son rôle majeur dans le cerveau a été démontré. Il serait impliqué dans la protection et la survie des neurones en inhibant les voies de l'apoptose et en favorisant leur différenciation morphologique (Buj-Bello et al., 1995; Pascual et al., 2011; Tansey et al., 2000).

La première publication montrant un rôle de GDNF dans le maintien de la spermatogenèse date de 2000 avec les travaux de Meng et al. Des souris transgéniques avec un KO hétérozygote pour *gdnf* survivent jusqu'à l'âge adulte, sont fertiles, mais présentent une spermatogenèse perturbée. En particulier, les tubes séminifères dégénèrent et chez les souris âgées, certains tubes ne contiennent plus aucune spermatogonie. A l'inverse, la surexpression de *gdnf* spécifiquement dans le testicule, induit l'accumulation de spermatogonies A indifférenciées (Apaired et Aal). Ces souris sont infertiles et développent des tumeurs testiculaires chez l'adulte (Meng et al., 2001). Ces informations ont permis d'affirmer un rôle crucial de GDNF dans la régulation du devenir des SSCs.

Grâce à des cultures à court terme (6 jours de culture) de cellules souches spermatogoniales, l'équipe de Hofmann (Braydich-Stolle et al., 2007; Hofmann et al., 2005) a pu montrer que les cellules cultivées en présence de GDNF formaient de gros amas et étaient beaucoup plus nombreuses que dans les puits contrôles (qui survivent et se multiplient aussi). Enfin, la culture à long terme de cellules spermatogoniales souches (jusqu'à deux ans) ne s'est avérée possible qu'avec l'addition du GDNF au milieu de culture, et ce pour de nombreuses espèces telles que la souris (Kubota et al., 2004), le rat (Ryu et al., 2005), le hamster (Kanatsu-Shinohara et al., 2008b), et le lapin (Kubota et al., 2011). Les cellules ainsi cultivées forment de grosses colonies composées de cellules spermatogoniales souches et non souches. GDNF est donc un facteur qui stimule la multiplication des cellules spermatogoniales souches via des divisions d'auto-renouvellement.

GDNF est un membre éloigné de la famille des TGFbeta. Son signal est transmis via un complexe de récepteurs composés de GFRA1, ancré à la surface membranaire de la cellule, et de RET, une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase (Airaksinen and Saarma,



---

2002). GDNF est exprimé par les cellules de Sertoli (au niveau ARNm et protéine) chez les rongeurs (Hellmich et al., 1996; Johnston et al., 2011). Cependant, son expression a aussi été évoquée par d'autres cellules somatiques ainsi que par les cellules germinales chez le rat (Fouchécourt et al., 2006) tandis que chez l'humain, ce serait les cellules périvitubulaires qui produisent GDNF (Spinnler et al., 2010). Plusieurs voies tyrosine-kinase sont mises en jeu lors de la fixation de GDNF à ses récepteurs : Src, Yes, Lyn et Fyn ont été identifiées (Braydich-Stolle et al., 2007; Hofmann et al., 2005). Src active notamment la voie PI3K/Akt induisant à terme l'expression de N-myc. En inactivant la voie Src, l'augmentation du nombre de cellules suite à un traitement GDNF est abolie. Par ailleurs, il est intéressant de remarquer qu'en culture, les effets de GDNF sont améliorés avec l'addition de GFRA1, soluble dans le milieu de culture (Kubota et al., 2004; Ryu et al., 2005). Enfin, GDNF n'apparaît cependant pas comme le seul facteur indispensable à la prolifération des spermatogonies souches puisqu'elles prolifèrent tout de même très peu en culture avec l'addition de GDNF seul.

Par des analyses de phylogénie *in silico*, les orthologues non mammaliens de *gdnf* et de son récepteur *gfra1* ont été identifiés (Airaksinen et al., 2006; Häntinen et al., 2007). Cependant, peu d'études ont été menées pour découvrir le rôle de ces gènes chez d'autres espèces que les mammifères. Chez le poisson-zèbre, les deux protéines sont détectées dans le cerveau et auraient un rôle dans le développement et la régénération de certains types neuronaux (Lucini et al., 2010; Schuster et al., 2010). Récemment, Wong et Collodi (2013) ont créé une lignée de feeder cell exprimant *lif* et *gdnf* de poisson-zèbre et montré que ces facteurs favorisent la prolifération des SSCs en culture (Wong and Collodi, 2013). Enfin, bien que le rôle de *gdnf* n'a pas été étudié chez le tilapia et la roussette, son récepteur est spécifiquement exprimé par une fraction des spermatogonies A chez ces deux espèces (Bosseboeuf et al., 2014; Santos Nassif Lacerda et al., 2013).

#### 4.2.2. D'autres facteurs stimulateurs de l'auto-renouvellement des SSCs

Afin d'identifier de nouveaux facteurs de croissance régulant l'auto-renouvellement des SSCs, les recherches ont été concentrées sur l'étude du rôle de facteurs connus pour stimuler la prolifération d'autres types de cellules souches. L'expansion du nombre de CGPs *in vitro* nécessite l'addition au milieu du basic fibroblast growth factor (bFGF ou FGF2) (Resnick et al., 1992). Kubota et al (2004) ont montré que l'addition de bFGF avec le GDNF favorise l'auto-renouvellement à long terme des cellules spermatogoniales souches, mais que le bFGF seul est incapable de produire des résultats similaires (Kubota et al., 2004). De même, l'équipe de



---

Kanatsu-Shinohara a testé plusieurs conditions de culture, avec sérum ou sans sérum et addition de bFGF et de GDNF sur des cultures à long-terme de SSCs (ou GS) (Kanatsu-Shinohara et al., 2003, 2005, 2006). Sans feeder layer, les GS ont continué à proliférer tant que GDNF, et bFGF ou eFGF (epidermal growth factor) étaient inclus dans le milieu de culture. Enfin, cette même équipe travaillant sur le hamster (*Mesocricetus auratus*) a montré que l'expansion des SSCs *in vitro* nécessite l'addition de bFGF au GDNF (Kanatsu-Shinohara et al., 2008b). Ces études démontrent que bFGF mais aussi possiblement EGF stimule la régulation par GDNF de l'auto-renouvellement des SSCs, bien que les mécanismes impliqués restent inconnus à ce jour. Il est intéressant de noter que FGF2 stimule l'expression de facteurs aussi stimulés par GDNF et impliqués dans l'auto-renouvellement des SSCs, BCL6B et ETV5.

Le rôle d'un autre facteur sur la prolifération des SSCs a été largement étudié *in vitro*. En effet, la cytokine LIF est connue pour son importance pour maintenir la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). L'ajout de LIF dans un milieu de culture contenant du sérum n'affecte pas la prolifération des SSCs de souris à court terme (Kubota et al., 2004; Nagano et al., 2003). Ces mêmes observations ont été décrites lorsque LIF en combinaison avec GDNF a été testé (Ryu et al., 2005). En revanche, LIF favorise la formation d'amas de cellules GS en culture mais n'affecte pas leur auto-renouvellement en culture à long terme (Kanatsu-Shinohara and Shinohara, 2007), suggérant donc que les cellules GS pourraient être plus de type CGPs plutôt que des vraies SSCs. La réponse cellulaire du LIF implique la liaison à un complexe composé du GPR130 (glycoprotéine 130) et d'un récepteur LIF spécifique (LIFR). Bien qu'une faible expression de GPR130 est détectée à la surface des SSCs en culture par cytométrie en flux (Kubota et al., 2004), l'expression du transcrit n'a pas été détectée dans un système de culture analogue (Oatley et al., 2006). En conséquence, ces études indiquent qu'au contraire de son rôle crucial dans les cellules ES, LIF n'est pas un régulateur majeur du devenir des SSCs, du moins chez les rongeurs.

CSF-1 régule la survie, la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques notamment des macrophages et monocytes chez les mammifères (Chitu and Stanley, 2006; Warren and Ralph, 1986), le poulet (Garcia-Morales et al., 2014), et les poissons (Hanington et al., 2009). (Oatley et al., 2009) a permis de montrer que la cytokine Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1) régule l'auto-renouvellement des SSCs de souris *in vitro* tout en n'affectant pas la prolifération des cellules déjà différenciées. Plus précisément, son addition au milieu de culture n'affecte pas le nombre de spermatogonies mais plutôt le nombre de cellules souches au sein de ces cellules. *In vivo*, la protéine est exprimée par les cellules de



---

Leydig chez la souris (Cohen et al., 1997). Chez le peccary, la protéine est détectée dans les cellules myoïdes périvitubulaires (Campos-Junior et al., 2012). Enfin, par des études de microarray, le récepteur de CSF1 (CSF1R) est détecté dans les populations de spermatogonies A<sub>s</sub> à A<sub>4</sub> (Kokkinaki et al., 2009). Toutes ces informations abondent dans le sens d'une régulation par CSF-1 de l'auto-renouvellement des SSCs mais pas de leur prolifération.

#### 4.2.3. *Le Stem Cell Factor (SCF ou kit ligand), un rôle à l'opposé de son appellation*

La voie de signalisation KIT/KIT LIGAND est essentielle pour le développement et la fonctionnalité des cellules hématopoïétiques, des mélanocytes et des mastocytes chez les mammifères et chez les poissons (Parichy et al., 1999, 2000). Ces informations sont entre autres issues d'études menées sur des souris présentant des mutations dans le locus *White Spotting W* (codant pour *c-kit*) et dans le locus *Steel Sl* (codant pour *kit ligand*). Certaines mutations homozygotes sont létales au stade embryonnaire, tandis que d'autres, homozygotes et hétérozygotes, ont des effets variés sur la fertilité, la pigmentation et peuvent provoquer des anémies (Besmer et al., 1993). Il y a en effet une variété et une sévérité des mutants des locus *W/W* et *Sl/Sl* chez la souris. Pour certains, il n'y a plus du tout de cellules germinales tandis que pour d'autres les souris sont fertiles (Koshimizu et al., 1992).

Par exemple, chez les mutants *SII7H/SII7H*, la transition entre A<sub>1</sub> et A<sub>1</sub> est inhibée (de Rooij and Grootegoed, 1998), indiquant donc qu'en dehors de son rôle connu dans la migration et la prolifération des CGPs (MINTZ and RUSSELL, 1957), SCF/C-KIT a aussi un rôle crucial dans la transition A<sub>1</sub> à A<sub>1</sub> dans la spermatogenèse. De plus, SCF/C-KIT a un rôle important dans la régulation du développement des spermatogonies A<sub>1</sub> à A<sub>4</sub>, puisque ces cellules meurent après l'administration d'un anticorps dirigé contre C-KIT *in vivo* et sont protégées par l'addition de SCF dans des tubes séminifères en culture (Yan et al., 2000).

La survie et la prolifération des spermatogonies A sont stimulées par l'administration de SCF *in vitro* (Allard et al., 1996). Tandis que les spermatogonies expriment le récepteur C-KIT, les cellules de Sertoli produisent son ligand, SCF (Manova and Bachvarova, 1991). La voie de signalisation KIT LIGAND apparaît nécessaire pour le maintien et la prolifération des spermatogonies A différenciées, mais pas pour l'étape d'initiation de la différenciation (Ohta et al., 2000, 2003). Cette voie est aussi critique pour la progression et la survie des cellules germinales pendant le stade pachytène de la méiose (Vincent et al., 1998; Yan et al., 2000). Ces informations convergent bien pour un rôle de l'activation de C-KIT par KIT LIGAND pour induire l'entrée en méiose des cellules germinales mâles (Rossi et al., 2008).



---

Il est aussi intéressant de remarquer que la voie de signalisation C-KIT/KIT LIGAND a aussi un rôle dans la gonade femelle. En effet, ce système joue un rôle primordial à divers stades de la folliculogénèse ; activation du follicule primordial, recrutement des cellules de la thèque, formation de l'antrum, et la maturation méiotique (Hutt et al., 2006). De même, des rôles similaires ont été découverts pour les orthologues poisson de des gènes *ckit/kit ligand* (Yao and Ge, 2010). En revanche, le rôle de cette voie n'a jamais été étudié au niveau testiculaire chez les téléostéens.

#### *4.2.4. Chez les téléostéens, IGF1 et AMH, des stimulateurs de la prolifération des spermatogonies A ou des SSCs ?*

Chez les téléostéens, peu d'études ont cherché à identifier une sous-population de spermatogonies A qui pourrait être les SSCs. De ce fait, les mécanismes régulant l'auto-renouvellement des SSCs chez les poissons restent encore une énigme. En revanche, plusieurs facteurs ont été identifiés pour avoir un rôle dans la prolifération et la différenciation des spermatogonies A, notamment IGF1, AMH et GSDF. L'expression des ARNm d'IGF1 et de son récepteur a été montrée dans les cellules germinales et dans les cellules de Sertoli chez la truite arc en ciel (Le Gac et al., 1996) et dans le testicule de tilapia (Berishvili et al., 2006). D'autres études ont montré un rôle stimulateur d'IGF1 sur la prolifération et/ou la différenciation des spermatogonies (Loir and Le Gac, 1994; Viñas and Piferrer, 2008). A la puberté, chez le saumon royal, l'initiation de la prolifération active des spermatogonies coïncide avec une élévation du taux d'IGF1 (Campbell et al., 2003). Lors de la différenciation des cellules germinales, l'expression de deux membres des TGFbeta, l'AMH et GSDF, montrent une dramatique inhibition dans les cellules de Sertoli (Mazurais et al., 2005). Afin d'examiner plus précisément le rôle de l'AMH, une protéine recombinante d'AMH d'anguille (eAMH) a été produite et ajoutée à un système de culture d'explants testiculaires d'anguille. La prolifération des spermatogonies est réprimée par l'addition de l'AMH. A l'inverse, l'addition d'un anticorps anti-eAMH permet d'observer la prolifération des cellules spermatogoniales (Miura et al., 2002). GSDF, un TGFbeta spécifique des téléostéens, augmente le nombre de CGPs chez l'embryon et stimule l'activité mitotiques des spermatogonies chez la truite pré-pubère (Sawatari et al., 2007).

Il est intéressant de noter qu'un rôle des IGF pour stimuler la différenciation des spermatogonies A a été montré chez certains amniotes. En particulier, Nakayama et al. (Nakayama et al., 1999) ont démontré que l'insuline-like factor- I et -II (IGF-I et IGF-II, respectivement), ainsi que l'insuline favorisent la différenciation des spermatogonies en spermatocytes primaires chez le



---

triton. Ces résultats sont cohérents avec les résultats d'une étude précédente de Tajima et al. (Tajima et al., 1995) qui montrent que le facteur de croissance IGF-I stimule la différenciation *in vitro* de spermatogonies A de souris. En revanche, un rôle direct de l'AMH sur la prolifération des spermatogonies n'a jamais été montré chez les mammifères.

### **4.3. Les hormones, messagers de l'organisme**

#### *4.3.1. La Fsh, régulateur positif de l'autorenouvellement des SSCs*

Toebosch et al. (Toebosch et al., 1988) ont démontré que la FSH agit indirectement sur les gonocytes en induisant l'expression de follistatine par les cellules de Sertoli. En utilisant des cultures à court terme d'explants de testicule de rat (post-natal), (Meehan et al., 2000) ont montré que la FSH additionnée de follistatine stimule la maturation des gonocytes en spermatogonies A, mais que la FSH seule ne le permet pas. En outre, la migration des gonocytes semble dépendre en partie de l'interaction de C-KIT avec son ligand qui est régulé par FSH (Orth et al., 2000). Par conséquent, il est probable que la FSH influence un ensemble de facteurs pour réguler le développement des gonocytes. Pourtant, la suppression de FSH *in vivo* n'affecte que très légèrement le nombre de gonocytes et leur taux de survie (Meachem et al., 2005) et *in vitro* le traitement FSH n'affecte pas la survie des gonocytes (Boulogne et al., 1999).

De même, les modèles de souris transgéniques montrent que la FSH soutient le début du développement des cellules germinales, mais qu'elle est incapable de soutenir pleinement la spermatogenèse (Allan et al., 2004; Chang et al., 2004). Chez les souris dépourvues de FSH (ou du FSHR) la testostérone seule peut qualitativement compléter la première vague de la spermatogenèse (Singh et al., 1995). Bien que la fertilité soit maintenue chez ces mutants, le nombre de spermatozoïdes est fortement affecté (Dierich et al., 1998; Sairam and Krishnamurthy, 2001). De plus, dans ces modèles transgéniques, le nombre de cellules de Sertoli est diminué. Les effets observés sur les populations de cellules germinales précoces peuvent donc résulter directement de la prolifération perturbée des cellules de Sertoli pendant la première vague de la spermatogenèse.

Chez les souris hypogonadotropes (hpg), la surexpression de FSH accroît le nombre de cellules germinales jusqu'au stade spermatide mais ne permet pas la spermiogenèse (Allan et al., 2004; Singh and Handelsman, 1996). Chez les rats adultes, la manipulation à court terme des taux de FSH modifie le nombre de spermatogonies A intermédiaires, les cellules les plus sensibles étant les spermatogonies A3- A4 (stade XIV-I) correspondant aux étapes maximales de FSHR dans les cellules de Sertoli (McLean et al., 2002a).



---

Plusieurs éléments prouvent que la FSH soutient la survie des spermatogonies chez le rat adulte, (Meachem et al., 1999; Shetty et al., 1996) sans augmenter directement la prolifération des cellules germinales *in vivo* (McLachlan et al., 1995). Par exemple, chez les rats immatures hypophysectomisés, l'administration de FSH réduit le nombre de cellules en dégénérescence (Russell et al., 1987) et empêche l'apoptose des cellules germinales (Tapanainen et al., 1993). Par contre, *in vitro*, la FSH favorise aussi la prolifération des spermatogonies différenciées dans des cultures d'explants testiculaires de rat (Boitani et al., 1993).

Tadokoro et al. ont établi que l'expression du GDNF par les cellules de Sertoli et la prolifération ultérieure de SSC étaient dépendants de la FSH (Tadokoro et al., 2002). Chez les mâles de souris mutantes *Sl/Sl* (mutant pour *kit ligand*), dont les testicules ne produisent que des spermatogonies A indifférenciées, la suppression de FSH diminue fortement la production de GDNF, et le taux de prolifération des spermatogonies diminue. A l'inverse, des cultures primaires de cellules de Sertoli répondent à la FSH par une augmentation de l'expression du GDNF et Simon et al ont confirmé ces données dans une lignée de cellules de Sertoli TM4 (Simon et al., 2007). Par conséquent, la production de GDNF par les cellules de Sertoli et l'auto-renouvellement des SSCs sont contrôlés localement et systématiquement.

#### 4.3.2. Les stéroïdes sexuels

On ignore si une coopération entre FSH et la testostérone est requise pour la prolifération des cellules germinales et il est possible que seule une faible quantité de l'une ou l'autre des hormones est nécessaire pour favoriser la prolifération. Le KO du récepteur aux androgènes se traduit par l'infertilité chez les mâles en raison de la perturbation de la production de spermatozoïdes (Eddy et al., 1996; Lyon and Hawkes, 1970). Le mutant du récepteur aux androgènes (*tfm*) induit lui une féminisation de la gonade chez l'individu mâle en raison de l'absence de transduction du signal des androgènes (Charest et al., 1991). Les testicules chez ces souris ne descendent pas dans le scrotum pendant le développement et ont peu de cellules germinales différenciées. La transplantation de cellules germinales de souris *tfm* permet une spermatogenèse complète indiquant que les cellules germinales mâles n'ont pas besoin de récepteurs aux androgènes fonctionnels pour leur différenciation (Johnston et al., 2001). Par contre la fonction des cellules somatiques de soutien de ce processus nécessite à la fois AR et ERalpha (Mahato et al., 2000).



---

#### 4.3.3. L'acide rétinoïque, engagement dans la voie de différenciation

Les cellules germinales mâles embryonnaires sont maintenues non prolifératives dans les tubes séminifères par la présence de CYP26B1 qui dégrade l'acide rétinoïque, en empêchant l'expression de STRA8 (stimulée par l'acide rétinoïque 8) et, donc l'engagement dans la voie de différenciation (Bowles and Koopman, 2007). Quand l'expression de CYP26B1 baisse, c'est NANOS2 qui maintient l'arrêt mitotique des cellules germinales mâles embryonnaires (Saga, 2008). Peu de temps après la naissance, les gonocytes (prospermatogonia) migrent du centre vers la membrane basale des tubes séminifères vers 6 jpp (jours post-partum). Elles commencent à se diviser et sont désignés comme spermatogonies Asingle (Oatley et al., 2006). Il existe un rôle clair de la vitamine A ou de l'acide rétinoïque dans le contrôle du devenir des spermatogonies de mammifères et dans l'initiation de la méiose (Griswold et al., 2012).

Depuis 1925, on sait que la vitamine A est nécessaire pour la spermatogenèse normale (Livera et al., 2002). Quand les rongeurs mâles sont carencés en vitamine A, la spermatogenèse cesse et on ne trouve que des spermatogonies A indifférenciées et des cellules de Sertoli dans l'épithélium séminifère (van Bragt et al., 2008; Griswold et al., 1989; McLean et al., 2002b; Mitranond et al., 1979; Unni et al., 1983). Par conséquent, un manque de vitamine A conduit à un blocage dans la capacité à se différencier des spermatogonies. Des expériences de culture *in vitro* ont montré que l'acide rétinoïque peut induire la différenciation des spermatogonies (Zhou et al., 2008), stimule l'expression de C-KIT et STRA8, et que les cellules germinales isolées en culture peuvent répondre directement à cette stimulation.



---

# PROJET DE THESE

« Vers l'identification des cellules souches spermatogoniales chez la  
truite (*Oncorhynchus mykiss*) : marqueurs, fonctions et voies de  
régulation »



---

## Contexte agronomique

La compréhension des processus de la spermatogenèse et de son contrôle chez les téléostéens présente un intérêt fondamental en biologie comparative ainsi qu'en aquaculture. La production piscicole ne cesse de croître bien que plusieurs limitations soient maintenues du fait de la méconnaissance de la physiologie des espèces notamment en termes de reproduction.

L'entrée en puberté constitue une problématique forte de l'élevage des poissons. Par exemple, chez certaines espèces comme l'esturgeon ou le thon, plusieurs années sont nécessaires pour atteindre la maturité sexuelle. Inversement, chez de nombreuses autres espèces comme les salmonidés, la carpe ou la morue, on observe un phénomène de maturation sexuelle précoce qui affecte négativement la croissance et la qualité de la chair, précocité d'autant plus problématique chez les mâles qu'ils mûrissent souvent une année plus tôt que les femelles. De plus, l'inhibition de la puberté est un enjeu environnemental concernant les souches domestiquées ou les espèces allochtones : il s'agit alors d'éviter ou limiter les échappements d'individus fertiles et dont la descendance entrerait en compétition pour les ressources des espèces autochtones ou participerait à une « pollution » génique des populations. Ces exemples soulignent l'intérêt de pouvoir intervenir sur la puberté pour l'accélérer ou la retarder selon l'espèce que l'on souhaite élever. Par ailleurs, une problématique particulière aux espèces de vertébrés non mammaliens est l'impossibilité de congeler les ovocytes et les embryons, et donc de stocker à long terme l'information génétique de souches d'intérêt commercial et du génome des espèces menacées. Dans ce contexte, la cryoconservation des cellules souches est une méthode alternative prometteuse.

Les cellules souches spermatogoniales (SSCs) sont le support de la production en quantité de gamètes matures et ce tout au long de la vie de l'individu. Elles représentent donc un point de contrôle clé pour l'initiation de la spermatogenèse et la qualité de production des spermatozoïdes. L'approfondissement des connaissances sur la biologie des SSCs apparaît donc comme une des voies pertinentes pour aborder la problématique de la maturation sexuelle dans un contexte piscicole au sein de l'équipe Physiologie Testiculaire et Puberté (PTP).



---

## Problématique scientifique

L'identification rigoureuse des SSCs est indispensable pour étudier leur biologie et les facteurs qui régulent leur destinée au sein de la niche germinale. Leur isolation grâce à des marqueurs spécifiques, puis leur culture et leur amplification *in vitro* à l'aide de régulateurs de prolifération spécifiques sont un pré-requis à l'utilisation des transplantations de SSCs entre donneurs et receveurs à des fins biotechnologiques.

Comme exposé dans l'introduction, beaucoup de données ont été accumulées chez les mammifères et en particulier chez les rongeurs dans le but d'identifier et de caractériser les cellules souches de la spermatogenèse. En particulier, des marqueurs plus ou moins restrictifs des spermatogonies indifférenciées ont été identifiés sans qu'aucun marqueur exclusif des SSCs n'ait été réellement obtenu. Le rôle de nombreux facteurs intrinsèques aux SSCs (dont certains de ces marqueurs) ainsi que de facteurs somatiques dans la destinée des potentielles SSCs ont été découverts. D'énormes progrès ont été faits concernant les méthodologies de transplantation de cellules souches aussi bien sur des modèles mammifères que poissons. De rares données utiles pour décrire ces cellules chez des espèces non-mammaliennes sont apparues récemment dans la littérature (voir la revue bibliographique). Pourtant, au commencement de ma thèse en 2010, aucun marqueur permettant de désigner de potentielles SSCs chez les poissons n'avait été identifié. De plus, le rôle de facteurs somatiques sur le devenir de ces dernières n'avait jamais été spécifiquement étudié.

## Objectifs

L'équipe PTP se concentre essentiellement sur l'étude morphologique et moléculaire de la spermatogenèse et la compréhension de ses régulateurs paracrines et endocrines pendant la transition pubertaire. Pour cette équipe, aborder la puberté via la biologie des cellules souches fut une approche nouvelle initiée en 2010. L'objectif de mon projet de thèse fut donc de développer notre compréhension des spermatogonies souches à l'aide des critères morphologiques, moléculaires et fonctionnels chez les poissons téléostéens, en explorant un modèle au cycle reproducteur annuel strict : la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*).



---

## Démarche générale

### *Un premier volet visait à identifier les SSCs chez la truite.*

- Une première approche a consisté à caractériser les probables SSCs selon des critères morphologiques potentiellement valides chez toutes les espèces et en tentant d'approcher l'hétérogénéité des spermatogonies A indifférenciées dans un stade donné et au cours du cycle afin de tirer bénéfice de la forte cyclicité du modèle.
- Une seconde approche a concerné l'étude moléculaire de gènes essentiels dans la biologie des cellules souches spermatogoniales chez les autres vertébrés, en particulier chez les mammifères. En effet, ces gènes non seulement contrôlent probablement la destinée des SSCs, mais constituent aussi potentiellement d'excellents marqueurs moléculaires pour désigner ces cellules et de ce fait constitueront des outils éventuels pour les purifier. En l'absence d'anticorps spécifiques, notre démarche a principalement reposé sur l'identification des orthologues de truite de ces gènes, puis sur l'étude de leurs profils spatio-temporels d'expression en relation avec les événements du développement spermatogénétique.
- Une troisième approche a concerné la transplantation de populations de cellules germinales dans des individus receveurs. En effet il fallait coupler les données morphologiques et moléculaires acquises à un test de fonctionnalité démontrant le caractère « souche » des cellules étudiées. Afin d'examiner le caractère « souche » des populations de cellules purifiées par élutriation centrifuge, nous avons utilisé et adapté au laboratoire la technique de transplantation de cellules germinales dans la cavité péritonéale d'embryons receveurs mise au point par une équipe japonaise (Takeuchi et al., 2003). Cette technique nous est parue plus prometteuse et répétable que l'injection dans les voies efférentes du testicule dans des individus adultes traités pour détruire leur spermatogenèse endogène, approche de choix chez les mammifères.

Ces aspects sont développés dans le premier chapitre de ce mémoire sous la forme d'un article soumis à *Biology of Reproduction* (en révision – corrections mineures) et de résultats complémentaires.



---

***Dans un second volet, nous avons amorcé la recherche de facteurs impliqués dans la régulation de la destinée des SSCs.***

La littérature mammalienne nous indiquait que leur amplification *in vitro* nécessiterait l'utilisation de régulateurs de prolifération spécifiques. En effet, nous souhaitions être en mesure de cultiver et amplifier ces cellules *in vitro* à des fins fondamentales (étudier *in vitro* les régulations de leur destinée), biotechnologiques (transplantation) ou encore à des fins de cryoconservation de grands nombres de cellules, dans des buts de conservation et régénération de génomes d'intérêt.

- Ce volet a été abordé en explorant deux voies connues de la régulation des spermatogonies : Gdnf/Gfra1 et Scf/c-Kit, *in vivo* au cours du cycle reproducteur et *in vitro* en culture d'explants testiculaires immatures ou en co-cultures cellules somatiques - Spg-A indifférenciées.
- Le potentiel mécanisme d'action des hormones gonadotropes sur les SSCs de truite à la puberté a aussi été abordé. En effet, la transition pubertaire est déclenchée par des signaux externes - climatiques, alimentaires ou sociaux - qui sont intégrés au niveau neuro-endocrinien et transmis vers les gonades par les hormones, notamment les hormones gonadotropes. Nous nous sommes, pour le moment, concentrés sur la Fsh, celle-ci étant la seule gonadotropine détectée dans le plasma sanguin au moment de la transition pubertaire chez les salmonidés. Son effet a été étudié *in vitro* notamment pour prendre en compte la faible disponibilité en hormone chez nos modèles.

Les résultats acquis et leur discussion sont présentés dans le deuxième chapitre du mémoire sous la forme d'un article en préparation (soumission prévue à *Biology of Reproduction* en février 2014) et de résultats complémentaires.

***Enfin, une tentative d'intégration de nos résultats et des perspectives*** qui en découlent est présentée dans la discussion générale de la thèse. Cet aspect du travail est en cours et continuera au-delà de la rédaction de ce mémoire.



---

# RESULTATS

## Volet 1

Identification de la population de cellules  
spermatogoniales souches au sein des cellules  
germinales testiculaires



---

Plusieurs caractéristiques permettent de reconnaître les cellules souches spermatogoniales (SSCs), au niveau morphologique, moléculaire et fonctionnel. Au commencement de cette thèse, peu de données avaient été obtenues pour décrire et identifier les SSCs chez des vertébrés non-mammaliens tels que les poissons téléostéens.

Un article soumis à *Biology of Reproduction* (en révision – corrections mineures) résume nos travaux menés pour identifier les cellules spermatogoniales souches chez la truite arc-en-ciel sur ces différents points.

## **I - “Spermatogonial stem cell quest: *nanos2*, marker of a sub-population of undifferentiated A spermatogonia in trout testis” – Article 1**

La production continue ou cyclique des spermatozoïdes tout au long de la vie de l'individu dépend d'une sous-population de cellules germinales indifférenciées, les cellules souches spermatogoniales. Les signaux gouvernant l'auto-renouvellement ou la différenciation de ces cellules est à peine compris, en particulier chez les espèces non-mammaliennes telles que les poissons. La truite est un poisson téléostéen dont le cycle reproducteur est fortement dépendant de la saison. En particulier, à la fin du cycle spermatogénétique, la lumière des tubes séminifères est remplie de spermatozoïdes et seules quelques rares spermatogonies A indifférenciées sont visibles au bord des tubules. Ces cellules sont considérées comme les cellules souches spermatogoniales, support du prochain cycle spermatogénétique. En prenant donc avantage de ce modèle et de cette particularité, nous avons pu identifier les probables SSCs dans les testicules de truite grâce à des approches morphologiques, moléculaires et fonctionnelles. Dans tous les stades étudiés (stade I, immature ; stade IV, pleine spermatogenèse ; et stade VIII, spermiation), de grosses spermatogonies présentant des caractéristiques ultra-structurales de cellules souches germinales ont été observées. Les profils d'expression d'homologues truites de marqueurs de SSCs et/ou progéniteurs décrits dans la littérature mammalienne ont été étudiés. En particulier, *nanos2*, *nanos3*, *pou2*, *plzf* et *piwil2* furent trouvés comme préférentiellement exprimés dans le testicule prépubère (immature 6 mois et 1 an) ainsi que dans la fraction de spermatogonies A indifférenciées purifiées par élutriation centrifuge. Ces profils d'expression permettent de supposer que ces gènes sont fonctionnellement conservés entre poissons et mammifères. De plus, la transplantation de spermatogonies indifférenciées dans des embryons receveurs a permis de démontrer leur caractère souche bien marqué en terme de colonisation de



---

la gonade du receveur ainsi que de leur capacité à produire des gamètes matures fonctionnels. Grâce à la technique d'hybridation *in situ* et à l'immunohistochimie nous avons pu approfondir le profil d'expression de certains de ces gènes. En particulier, nous montrons que le transcrite de *nanos2* a une expression restreinte à une sous-population de spermatogonies A indifférenciées (moins de 20%), présentes isolées ou en doublet dans le testicule d'immature (stade I) et maturant (stade IV). Par contraste, chez le spermiant, *nanos2* est détecté dans toutes les spermatogonies A indifférenciées résiduelles. Plzf est aussi détecté dans toutes les spermatogonies résiduelles du spermiant par immunohistochimie renforçant donc l'hypothèse que ces cellules sont des spermatogonies souches. Au vu de ces résultats, nous faisons l'hypothèse que la sous-population de spermatogonies A indifférenciées exprimant le transcrite de *nanos2* sont les spermatogonies souches chez la truite arc-en-ciel.



## **Spermatogonial stem cell quest: *nanos2*, marker of a sub-population of undifferentiated A spermatogonia in trout testis**

**Running title:** *nanos2*, marker of spermatogonial stem cells

**Summary sentence:** *nanos2* transcript is expressed by a subset of undifferentiated A spermatogonia in rainbow trout testis proposed as the putative spermatogonial stem cell population.

**Keywords:** stem cells, spermatogenesis, *nanos2*, *Oncorhynchus mykiss*, teleost

### **Authors and affiliations:**

Johanna Bellaïche<sup>1</sup>, Jean-Jacques Lareyre<sup>1</sup>, Chantal Cauty<sup>1</sup>, Ayaka Yano<sup>1</sup>, Isabelle Allemand<sup>2</sup> and Florence Le Gac<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR1037 Fish Physiology and Genomics, BIOSIT, Ouest-Genopole Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes, France

<sup>2</sup> Laboratory of Gametogenesis, Apoptosis and Genotoxicity, INSERM, U967 Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, CEA, Univ Paris VII, Fontenay aux Roses, France.

### **Corresponding author:**

legac@rennes.inra.fr

Phone: (+33) 2 23 48 50 02

Fax: (+33) 2 23 48 50 20



---

## ***Abstract***

Continuous or cyclic production of spermatozoa throughout life in adult male vertebrate depends on a sub-population of undifferentiated germ cells acting as spermatogonial stem cells (SSCs). What makes these cells self-renew or differentiate is barely understood, in particular in non-mammalian species including fish. In the highly seasonal rainbow trout, at the end of the annual spermatogenetic cycle, tubules of the spawning testis contain only spermatozoa with the exception of scarce undifferentiated spermatogonia that remain on the tubular wall, which will support the next round of spermatogenesis. Taking advantage of this model, we identified putative SSCs in fish testis using morphological, molecular and functional approaches. In all stages, large spermatogonia with ultrastructural characteristics of germinal stem cells were found, isolated or in doublet. Trout homologs of SSC and/or immature progenitor markers in mammals, *nanos2* and *nanos3*, *pou2*, *plzf* and *piwil2*, were preferentially expressed in the prepubertal testis and in the undifferentiated A spermatogonia populations purified by centrifugal elutriation. This expression profile strongly suggests that these genes are functionally conserved between fish and mammals. Moreover, transplantation into embryonic recipients of the undifferentiated spermatogonial cells demonstrated their high ‘stemness’ efficiency in terms of migration into gonads and ability to give functional gametes. Interestingly, we show that *nanos2* expression was restricted to a sub-population of undifferentiated spermatogonia (less than 20%) present as isolated cells or in doublet in the juvenile and in the maturing trout testis. In contrast, *nanos2* transcript was detected in all the undifferentiated spermatogonia remaining in the spawning testis. Plzf was also immunodetected in A-Spg from spawning testis, which reinforces the idea that these cells are stem cells. From those results, we hypothesize that the subset of undifferentiated A spermatogonia expressing *nanos2* transcript are putative SSC in trout.



---

## ***Introduction***

Spermatogonial stem cells (SSCs) are adult stem cells defined by their self-renewal and differentiation ability to maintain a supply and to enable the production of a large amount of mature spermatozoa. The characterization of adult SSCs requires reproducible methods to isolate and maintain them in long-term culture. Despite the fact that SSCs were discovered and have been studied for more than fifty years in mammals [1], their characteristics and the regulating factors involved in their fate have only partially been demonstrated. Photonic and transmission electron microscopy observations [2, 3] combined with gene expression analysis have resulted in the identification of putative spermatogonial stem cell populations in various model species. More precisely, specific gene expression of the undifferentiated germ cell population in mouse (A single, As, to A aligned, Aal) have been thoroughly described [4]. Even though As are likely to be the initial germ stem cells, there is accumulating evidence that Aal should be considered as additional stem cell entities in certain circumstances at least [5].

Currently, only functional assays based on SSCs expansion in vitro during long-term culture or based on the ability of a purified cell population to colonize a recipient gonad after in vivo transplantation and to participate in the host spermatogenesis can be used to verify the ‘stemness’ property. Initially developed in mouse by Brinster in 1994 [6], different transplantation techniques have been adapted and developed in various fish species [7-10]. In particular, Yoshizaki and collaborators showed that spermatogonial populations isolated from mature testes resulted in the production of functional spermatozoa or eggs when transplanted into male or female embryo recipients respectively [11]. Furthermore, they have established xenogenic transplantation systems for spermatogonia in several fish species [12] that could be useful in agronomic term to shorten the generation time of high economic interest fish. Still, there is a tremendous lack of knowledge in undifferentiated spermatogonia in fish including SSCs, and important challenges remain before the isolation, propagation and conservation of adult SSCs can be used in the field of applied biotechnology.

Investigations of fish spermatogenesis have been performed, to a large extent, from the point of view of morphology and endocrinology (for review [13]). Recent reports have proposed molecular markers for male germ cells in different states of differentiation in trout. Transgenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the GFP gene driven by vasa- promoter (pvasa-GFP) has been used to isolate cells at different stages of spermatogenesis, which show dramatic changes in their GFP intensity during the process, and *notch1*, *piwil2*, were identified as markers for trout spermatogonia, *scp3*, and *shippo1* for spermatocytes, and spermatids,



---

respectively [14, 15]. Also, Ly75 protein was identified as a marker of mitotic germ cells and is proposed as a cell surface marker to sort spermatogonia [16]. Despite these efforts to propose germ cell markers in fish species, there is still a need to recognize and isolate the populations of spermatogonial stem cells.

Among the proposed markers of SSCs in rodents, some seem to be also expressed in the undifferentiated germinal cells in phylogenetically distinct species. Indeed, *Plzf*, discovered because its repression induced spermatogonial differentiation in mouse [17, 18], is now proposed as a SSCs marker in chondrichthyans [19] and other mammals [20]. In addition, *Oct4/Pou5f1* is expressed in SSCs in mouse [21] and various other mammalian species like the buffalo [22] or the cat [23]. Interestingly, its homolog, *pou2* was recently identified in early spermatogonia in medaka [24]. Other suggested markers of germ stem cells are the *Nanos* gene family. *Nanos* was first identified in drosophila as an embryonic posterior determinant [25] and later its implication in primordial germ cell development was revealed [26, 27]. Three *Nanos* homologs have been identified in vertebrates to date [28]. In mouse, NANOS2 has been reported as a specific marker of male germinal stem cells (As and Apr) while NANOS3 is expressed in PGC of both sexes and in undifferentiated A spermatogonia (some As to A1) [29-31]. In medaka and zebrafish, *nanos2* is detected in adult undifferentiated germinal cells, while *nanos3* is expressed preferentially in PGCs [28, 32] and more precisely, *Nanos2* is expressed in pre-meiotic oogonia that are proposed as the ovarian germ stem cells [33]. Still, finding molecular markers of the spermatogonial stem cell population in fish remains a challenge in order to investigate the molecular events that determine their fate in terms of proliferation or differentiation throughout the reproductive cycle, or in culture.

In trout, spermatogenesis occurs synchronously within cysts and the spermatogenic development of the testis follows a strict annual reproductive cycle. Studying the mechanism of spermatogenesis in trout testes has already provided unique opportunities to improve our understanding of the process [34] and of the underlying molecular mechanisms [35-37]. Interestingly, during the trout reproductive cycle, only undifferentiated A spermatogonia (A-Spg) are observed in the seminiferous epithelium before active spermatogenesis starts. Again at the end of the cycle, when spermatogenesis has come to a halt and the tubules lumen are packed with spermatozoa, only a few scattered and inactive spermatogonia can be found. The objectives of the present study were to take advantage of the spatio-temporal organization of spermatogenesis in the trout to identify the spermatogonial stem cells on a morphological, molecular and functional level. Besides, rainbow trout spermatogonia can be isolated by centrifugal elutriation [38, 39] and we further developed this method to produce cell fractions



---

enriched in undifferentiated and differentiated germ cells, to analyze their expression of SSCs candidate marker genes and compare their ‘stemness’ property in transplantation studies.

One important finding of our study is that the *nanos2* transcript is expressed in a sub-population of undifferentiated A spermatogonia in the immature testis and in all the rare undifferentiated germ cells remaining in an inactive state in between two spermatogenetic cycles. Furthermore, the isolated A-Spg fractions with morphological characteristics of undifferentiated spermatogonial cells and with the highest *nanos2* relative expression levels demonstrate high ‘stemness’ capacity in transplantation studies. Accordingly, we propose that *nanos2* transcript is a reliable marker of putative SSCs in fish



---

## ***Material and Methods***

### **Ethics Statement**

Experimental research on animals reported here was performed in conformity with the principles for the use and care of laboratory animals in compliance with French and European regulations on animal welfare. Furthermore, experimenters have an authorization, given by the French 'Direction des Services Veterinaires' to conduct or supervise experimentation on live animals.

### **Animals and tissue sampling**

Male rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) were obtained from INRA experimental fish farm (PEIMA, Drennec) and kept in the laboratory facilities at 12°C under natural photoperiod until the experimental day. Fish were anesthetized in 2-phenoxyethanol (10mg/ml water) and killed by a blow on the head. Tissues (brain, pituitary, heart, muscle, gill, stomach, liver, intestine, skin, spleen and kidney) were sampled from pre-pubertal male trout. Sperm producing testes (from spawning males) and pre-vitellogenesis ovary from female rainbow trout were also collected. All tissues were sampled from three different individuals. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C until RNA extraction. In order to describe gene expression during spermatogenetic development, testes were collected from 6 months old juveniles and one year old pre-pubertal fish (immature, stage I), and at different stages of the reproductive cycle (described in [40, 41]). Testes were recovered, weighed to determine the gonadosomatic index (GSI) and tissues were rapidly immersed in paraformaldehyde or Bouin's solution for further histological analyses, or frozen until RNA extraction. Accurate determination of testicular developmental stages was achieved by combining histological analysis of Bouin's solution fixed samples (on the basis of the most differentiated germ cell type present in the gonad) and GSI as previously described in details in Gomez et al. [40, 42]. Gonads from 4 to 5 individuals in juvenile stages I, II, III-IV, V-VI VII and VIII were used for RNA extraction.

### **Germ cell isolation**

Populations of germ cells at different stages of differentiation were obtained from immature males (stage I) or maturing males (stages III-IV) as previously described [36, 37]. In brief, testes were minced, submitted to enzymatic digestion, followed by mechanical dispersion using a Dounce homogenizer. The resulting cell suspensions were filtered through nylon gauze



---

(150µm, 50µm and 32µm pore size) and pelleted by centrifugation. The cell pellets were resuspended in L15 medium with 1% BSA, loaded onto 90% percoll gradients and centrifuged for 40min at 500g and 5min at 50g to remove cell clusters, erythrocytes and most spermatozoa, if present. The upper floating layers were recovered and submitted to cell sorting by centrifugal elutriation (JE5 Beckman Instruments). Cell separation was performed at constant rotation speed (2000 rpm) and increasing flow rates (6.6, 7.8, 8.6, 9.5, 10.5, 13.5, 15.1, 19 and 21 ml/min) in L15 media with 0.5% BSA. Collected fractions were rinsed, pelleted and either transferred in Trizol reagent and stored at -80°C for RNA or used for microscopic observation after fixation in Bouin's solution. Germ cell populations were obtained by pooling 19 and 21 ml/min elutriation fractions (A-Spg), 10.5-13.5 ml/min fractions (B-Spg), 8.6-9.5 ml/min fractions (Spermatocytes), while the post-meiotic enriched samples corresponded to 6.6-7.8 ml/min pooled elutriation fractions.

### **Electron microscopy**

The gonads (stage I, stage IV and stage VIII) were fixed by immersion in 2% glutaraldehyde fixative for 24h at 4°C, buffered to pH 7.3 with 0.12 M cacodylate CaCl<sub>2</sub> buffer. After washing, the samples were postfixed in 2% osmium tetroxide for 2 hours, dehydrated in a graded ethanol series and finally embedded in epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate solutions and lead citrate and examined under a JEOL JEM-1400 electron microscope at the Microscopy - Rennes Imaging Center (MRic) laboratory.

### **Real-time PCR analysis**

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) and further purified with NucleoSpin RNA II kit (Macherey Nagel EURL, Hoerd, France). RNA concentrations were quantified using NanoDrop ND-10 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and RNA quality was determined using the Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Five hundred nanograms of total RNA was reverse transcribed using random hexamers and the GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega). Quantitative Polymerase Chain Reactions (Q-PCR) were conducted using the StepOne Plus thermocycler (Applied Biosystems). Control reactions were performed in the absence of reverse transcriptase. Real-time PCR oligonucleotide primers (see supplementary table) were designed using the Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) and were verified with the oligoanalyser 3.1 web interface (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) to avoid self and heterodimer formation as well as hairpin structures. Nucleotide sequences of the primers were also



---

systematically matched (BLAST algorithm) against the SIGENAE trout contigs collection (som.10 version) to avoid non-specific annealing to other transcripts. PCR amplification was performed on 1/10 diluted first-strand cDNA templates, 1X Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) fluorescent dye and 600nM of both forward and reverse primers. The cycling conditions were as follows: 95°C for 20s, followed by 40 cycles at 95°C for 3s and 60°C for 30s. All RT samples were measured in duplicate. For the panel of tissues, gene expression level was normalized by *18s* gene expression and the highest tissue expression was arbitrarily set to 100. In testicular and cellular experiments, gene expression level was normalized by *rs15* (clone 1RT58B15\_B\_A08) gene expression and compared to gene expression level of 1 year old immature testis expression, arbitrarily set to 100. The *rs15* gene was chosen on the basis of its invariant expression in all our previous experiments with the trout testis [36]. The efficiency of PCR amplification was verified using serial dilutions of pooled RT products and the melting curve analysis was performed at the end of each real time PCR assay to verify the amplification of a single PCR product. Statistical analyses were performed with R software using the non-parametric ANOVA of Kruskal-Wallis and the Mann & Whitney test U, if a statistical difference ( $p < 0.05$ ) was observed between groups in the ANOVA analysis.

### **Riboprobe synthesis and *in situ* hybridization**

Bacterial clones were obtained from the CRB GADIE resource center (Jouy-en-Josas, France) or from the USDA (Washington D.C., USA). cDNA inserts were amplified by PCR using vector-specific primers. PCR products were purified and used as templates for digoxigenin (DIG)-labeled probe synthesis using the Riboprobe® Combination system – T3/T7 RNA polymerase (Promega). As *nanos2* was not found in rainbow trout cDNA libraries, a sequence (accession number KJ123762) was cloned using specific primers (supplementary table). In situ hybridization experiments were performed on 5 µm sections of paraformaldehyde fixed and paraffin embedded trout testes. After dewaxing and rehydration, all the following steps were performed using the In situPro VS automate (Intavis Bioanalytic Instruments). Briefly, sections were post-fixed (paraformaldehyde 4%, 20 min), permeated for 20 min at 37°C with 1 µg/mL Proteinase K, for 10 min in 50 mM glycine and post-fixed again (paraformaldehyde 4%, 10 min). Slides were then pre-hybridized for 2 hours at 60°C (formamid 50%, 2× SSC, 1× Denhardt, dextran sulfate 10% and yeast tRNA at 250 µg/ mL) and hybridized for 12 hours at 60°C with 2 ng/µL of DIG-labeled cRNA probes in the same buffer. After hybridization, the sections were treated for 30 min at 37°C with RNase (10 µg/mL in 2×SSC), washed successively at 37°C in 2× and 0.1×SSC, incubated in a blocking solution containing 2% sheep



---

serum for 40 min then for 2 hours with alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche Applied Science; 1:1000) in 2% sheep serum. Slides were finally rinsed, revealed for 12 hours with NBT/BCIP chromogen (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Ind., USA) or with the HNPPfast red detection kit (Roche Diagnostic) for fluorescent in situ hybridization of *nanos2* and *vasa*. Whole mount in situ hybridizations for 65dpf fish were performed as previously described [43]. Negative controls; sense probe (for each gene studied) and condition without probe were done for each hybridization experiment (ISH and WISH).

### **Plzf immunodetection**

Gonads were fixed overnight at 4°C with Bouin's fluid, rinsed and dehydrated in successive alcohol baths with increasing concentrations. The samples were embedded in paraffin and 5µm thick sections were mounted on poly-L-lysine coated glass slides (Thermo Scientific). After paraffin removal in toluene, the tissue sections were rehydrated and boiled twice for 5 min in a 10 mM sodium-citrate solution for antigen retrieval. Non-specific binding sites were blocked by incubating the sections with 5% bovine serum albumin in PBS. Subsequently, the slides were incubated overnight at 4°C with the primary antibody anti-PLZF (1:50; sc-22839, Santa Cruz Biotechnology Inc.). After washing in PBS, slides were incubated at room temperature with the secondary antibody (Alexa Fluor® 488 anti-rabbit IgG) diluted 1:100. For western blotting experiments, isolated testicular cells from immature fish were homogenized in protein extraction buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM Benzamidine) supplemented with the anti-protease cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). The primary antibody was detected using horseradish peroxidase-conjugated mouse anti-rabbit IgG and visualized with the enhanced chemiluminescence system (Thermo Scientific Pierce Biotechnology).

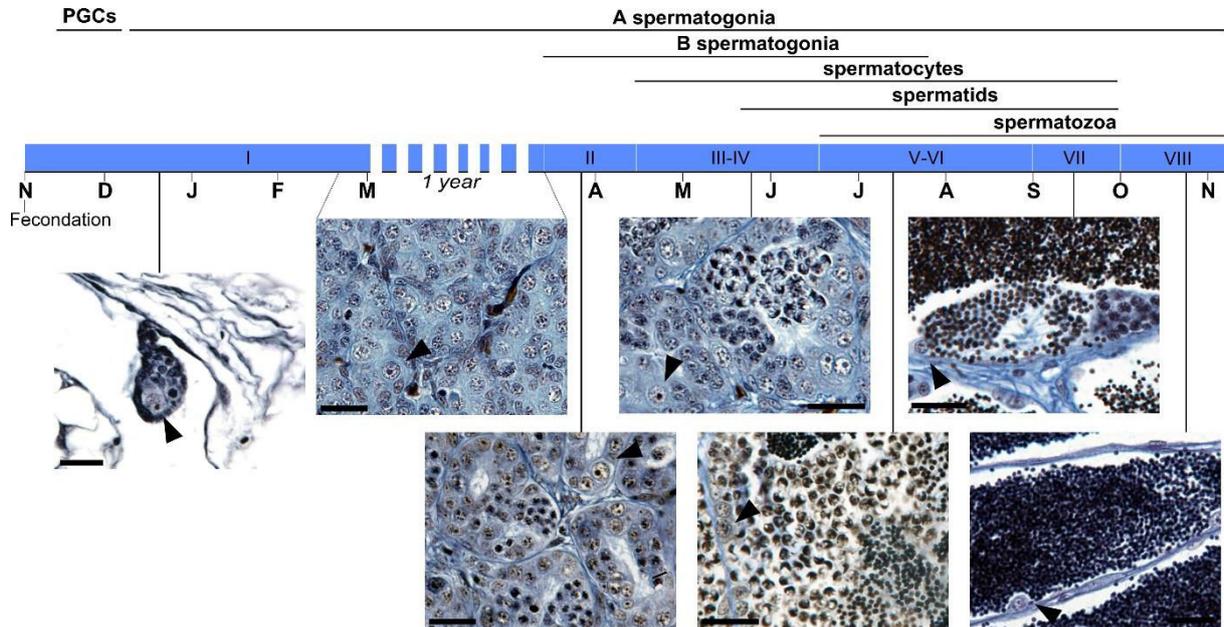
### **Transplantation assay**

In order to have an endogenous marker of the transplanted cells in the host, we used isolated testicular cells originated from a transgenic trout line expressing GFP under the *myosin light chain-2* promoter (*mlc2::GFP*) [44]. A 15 nl sample of a suspension containing approximately 10,000 cells was transplanted into the peritoneal cavity of peri-hatching embryos (300°). Recipients were from an all-male monosexed population. All transplantation experiments were performed using 30-90 embryos each. Six months after transplantation, half of the transplants were killed and their testes collected for PCR detection of the transgene. DNA was extracted from the recipient testis in 500µl containing 10% chelex and proteinase K (0.2 µg/µl) after a



---

1000-rpm agitation overnight at 42°C. DNA was purified with a phenol/chloroform (1:1) extraction and then ethanol precipitated. PCR was performed with GFP-specific primers (supplementary table), to examine the amount of transgene in recipient fish. The other half of the transplanted recipients was reared until maturity (12 to 24 months). Milt was collected and 200 eggs of wild type female trout were fertilized in duplicate for each individual. After hatching, transgenic embryos were counted in the offspring by direct observation of fluorescent muscles using the AZ100 Macroscope (Nikon) equipped with a GFP-BP filter (520/35 nm). Ectopic presence of the transgene was also verified by PCR after extracting DNA from other tissues (muscle, liver and intestine) in positively detected recipient fish.



**Figure 1** (Figure 12)

### Light microscopy observations of testicular tissue along the spermatogenic cycle

Histological sections of the rainbow trout testis during testicular development (roman numbers I to VIII indicate the gonadal stages during the spermatogenic cycle; letters indicate months). Arrowheads indicate undifferentiated A spermatogonia at each testicular stage. In the juvenile testis, undifferentiated A spermatogonia (und A-Spg) are the only germ cells present and they proliferate slowly. After the onset of puberty, A-Spg surrounded by supportive Sertoli cells give rise to more differentiated B spermatogonia (B-Spg) that go through 6 rapid cycles of proliferation inside a given cyst. New cysts of B-Spg are actively formed from stage II until stage V, and then the production rate progressively decreases towards the end of the spermatogenic cycle. In spawning males, the period of sperm excretion, the lumen of the testicular tubules are packed with spermatozoa and only scattered undifferentiated A spermatogonia line the wall of the testicular tubules. These few remaining spermatogonia are likely to be the adult spermatogonial stem cells that will sustain the following round of spermatogenesis during the next reproductive cycle. Scale bar = 25µm. Staining: Regaud Haematoxylin-Orange G-Aniline blue.

---

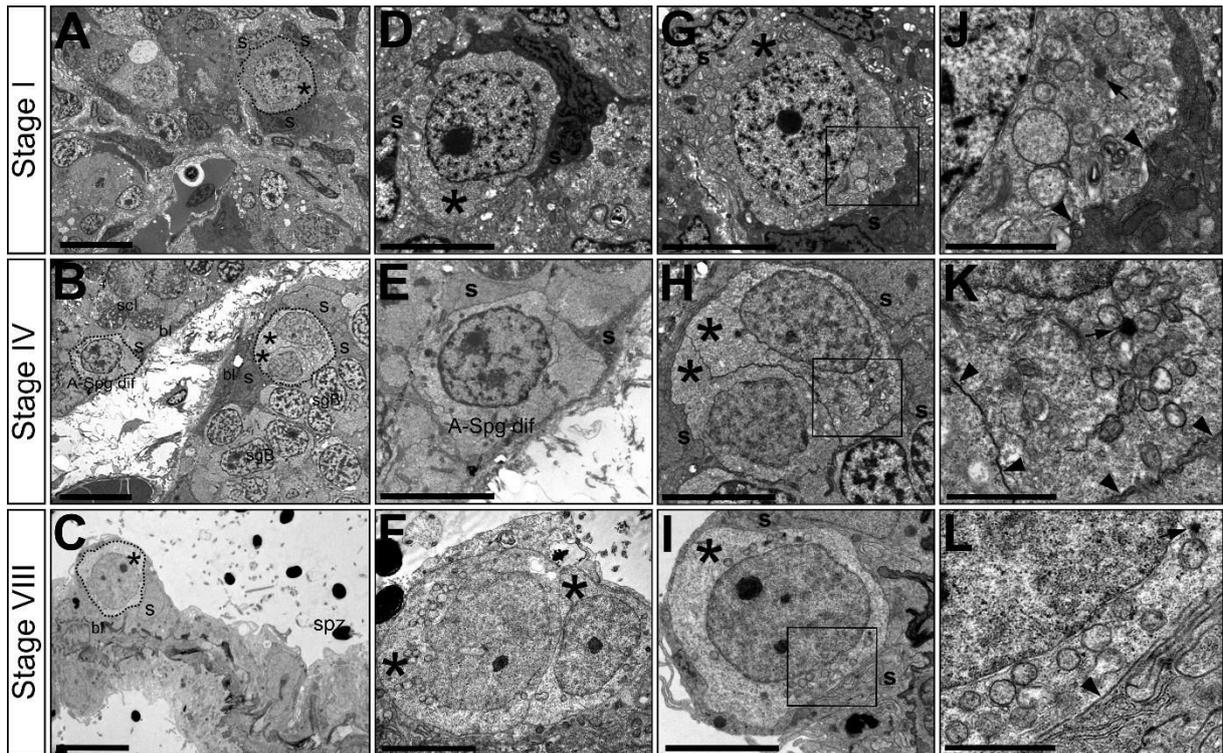
## ***Results***

### **Morphological characterization of the undifferentiated A spermatogonia**

The first objective of our study was to identify the putative spermatogonial stem cell population in rainbow trout testes on a morphological level. Trout is a seasonal breeder and stages of testicular maturation are defined based on the progression of the germ cell line differentiation (Fig. 1A). Spermatogenesis occurs in cysts of clonal germ cell clusters. In the juvenile testis, undifferentiated A spermatogonia (und A-Spg) are the only germ cells present and they proliferate slowly. At that stage (stage I), the cystic organization is not clearly distinguishable. After the onset of puberty, some A-Spg surrounded by supportive Sertoli cells give rise to more differentiated spermatogonia named B-Spg, that go through six rapid cycles of proliferation inside a given cyst. These cystic cells have intercellular bridges and form syncytia with 2, 4, up to 64 spermatogonia [45]. New cysts of B-Spg are actively formed until stage V, and then the production rate progressively decreases towards the end of the spermatogenetic cycle. In spawning males, during the period of sperm excretion (stage VIII), the lumen of the testicular tubules are packed with spermatozoa and only scattered undifferentiated A spermatogonia line the walls of the testicular tubules. These few remaining spermatogonia are likely to be the adult spermatogonial stem cells that will sustain the following round of spermatogenesis during the next reproductive cycle. In the present study, we focused our observations on three stages of testicular maturation, stage I (immature) containing only A undifferentiated spermatogonia, stage IV (maturing) for the spermatogonial expansion and differentiation, and stage VIII (spawning) containing adult spermatogonial stem cells.

Using transmission electron-microscopy (Fig. 2A-C), we identified in all three stages the undifferentiated spermatogonia as large isolated cells with a poorly fragmented nucleolus (only one to three fragments) and a low electron density (clear) cytoplasm. At stages IV and VIII, these germ cells were located next to the tubular wall but not directly in contact with the basal lamina. In particular, we observed one to three Sertoli cells surrounding one A spermatogonia, which is a typical characteristic of fish cystic testis structure. We couldn't detect specific localization as regard to the position of blood vessels. Interestingly, we frequently observed doublet of undifferentiated germ cells in the adult stages (stages IV and VIII). These cells looked alike with no observed intercytoplasmic bridges, and they could also be considered as potential SSCs based on those morphological observations.

Considering other germ and stem cell characteristics, all identified cells had electron dense structures (nuage and/or cement) associated with numerous round mitochondria present in the



**Figure 2** (Figure 13)

**Electron microscopic observations of the undifferentiated spermatogonia population**

**A-C.** Wide view of testis section at stage I (A), stage IV (B) and stage VIII (C). Large undifferentiated spermatogonia (\*) with a clear cytoplasm are found isolated or in doublet. A-Spg dif, differentiated A spermatogonia, B-Spg, B spermatogonia, scl, primary spermatocytes, s, Sertoli cells, and bl, basal lamina. Scale bar = 10 $\mu$ m.

**D-I.** Focus on putative spermatogonial stem cells at each testicular stage. Cells present 1 to 3 nucleoli and few heterochromatin in the nucleus. Scale bar = 5 $\mu$ m.

**J-L.** Inset of high magnification of one part of the spermatogonial stem cells. Numerous round mitochondria, cement or nuage (arrow) and specialized junctions (arrowhead) between germ cell or with Sertoli cells are observed in all identified undifferentiated spermatogonia. Scale bar = 2,5 $\mu$ m.

---

cytoplasm (Fig. 2J-L). We found specialized junctions between the spermatogonia and the Sertoli cells frequently, but also between the doublets of spermatogonia. Interestingly, we observed ultrastructural differences between undifferentiated spermatogonia in various stages with respect to the aspect of the nucleus. At stage I, the nucleus of the spermatogonia had a dark, well defined nucleolus. In addition, the nucleoplasm had a mottled aspect with spots of condensed heterochromatin (Fig. 2D and G). In stage IV, lesser flecks of heterochromatin were observed (Fig. 2 H). Then, at stage VIII, few or no flecks of heterochromatin were observed in the nucleus (Fig. 2F and I) and the nucleolus seemed clearer and smaller, although no morphometric study was performed. By contrast, the differentiated spermatogonia harbored much more chromatin near the nuclear membrane and, if present, had a poorly defined nucleolus (Fig. 2B and E).

To summarize, we observed two populations of cells with spermatogonial stem cell characteristics in adult testis: undifferentiated A spermatogonia either isolated or in clusters of two closely associated. Moreover, subtle differences in the appearance of the nucleus were also observed depending on the testicular maturation stage.

### **Expression profiles of candidate spermatogonial stem cell markers**

Based on mammalian or fish evidences, potential markers of spermatogonial stem cells or of spermatogonial progenitors were selected and their homologs searched for in rainbow trout nucleic sequences (Table 1). Of particular interest, two members of the *nanos* family, *nanos2* and *nanos3* closest homologs were identified in trout as illustrated by the conserved amino acids motifs on the C-terminal tail of the predicted protein with the mammalian and teleost NANOS (supplemental Fig. 1). Only one *nanos2* homolog was detected in salmonid genomes and cDNA databases.

The tissue distribution of the candidate transcripts was first studied by real-time quantitative PCR using a panel of 14 different tissues collected from one year old juvenile trout and fully mature males (Fig. 3). We observed that *pou2a* and *b* (fish homologs of the mammalian *Pou5f1/Oct4*), *plzfa* and *b*, *piwil2*, *nanos2* and *nanos3* were preferentially expressed in the gonads, although *pou2* and *nanos3* absolute expressions were low. Furthermore, these genes presented contrasted profiles in the testis and ovary, like *pou2* genes which were strongly expressed in the pre-vitellogenic ovary or conversely *nanos2* which was preferentially expressed in the testis. As those genes are known to be expressed in testes of other species and involved in early germ cell fate in rodents, our results strongly suggested conservation of these genes in trout gonadal function.

Mouse gene name	Trout homolog	Accession No.	Mouse gene expression	Germline role	Ref.	Protein % identity (a)
<i>Pou5f1/Oct4</i>	<i>pou2a</i>	MMSRT111E_scaff_2087_1	SSCs - As to Aal and spermatids	Maintaining the undifferentiated state of SSCs	[65]	30,42
	<i>pou2b</i>	MMSRT116F_scaff_1437_1				31,99
<i>Plzf</i>	<i>plzfa</i>	scaffold_650	SSCs - As to Aal	Maintaining the undifferentiated state of SSCs	[17,18]	59,54
	<i>plzfb</i>	MMSRT080C_scaff_2094_1				68,04
<i>Nanos2</i>	<i>nanos2</i>	KJ123762	SSCs - As to Apr	Inhibition of meiosis	[66]	28,38
<i>Nanos3</i>	<i>nanos3</i>	AB787269	SSCs – some As to A1	Stimulating SSCs self-renewal		26,69
<i>Piwil2/Mili</i>	<i>piwil2</i>	NM_001124242	Spermatogonia and primary spermatocytes	Essential for self-renewal and differentiation of SSCs	[55]	46,31
<i>Vasa/Ddx4</i>	<i>vasa</i>	NM_001124193	All germ cells	Proliferation and differentiation of germ cells	[67]	46,75
<i>Dazl</i>	<i>dazl</i>	NM_001246339	All germ cells	Promotes differentiation and entry into meiosis	[68]	29,48

**Table 1: Genes investigated in this study**

(a) %identity on the total sequence of the rainbow trout predicted protein and the mouse ortholog.

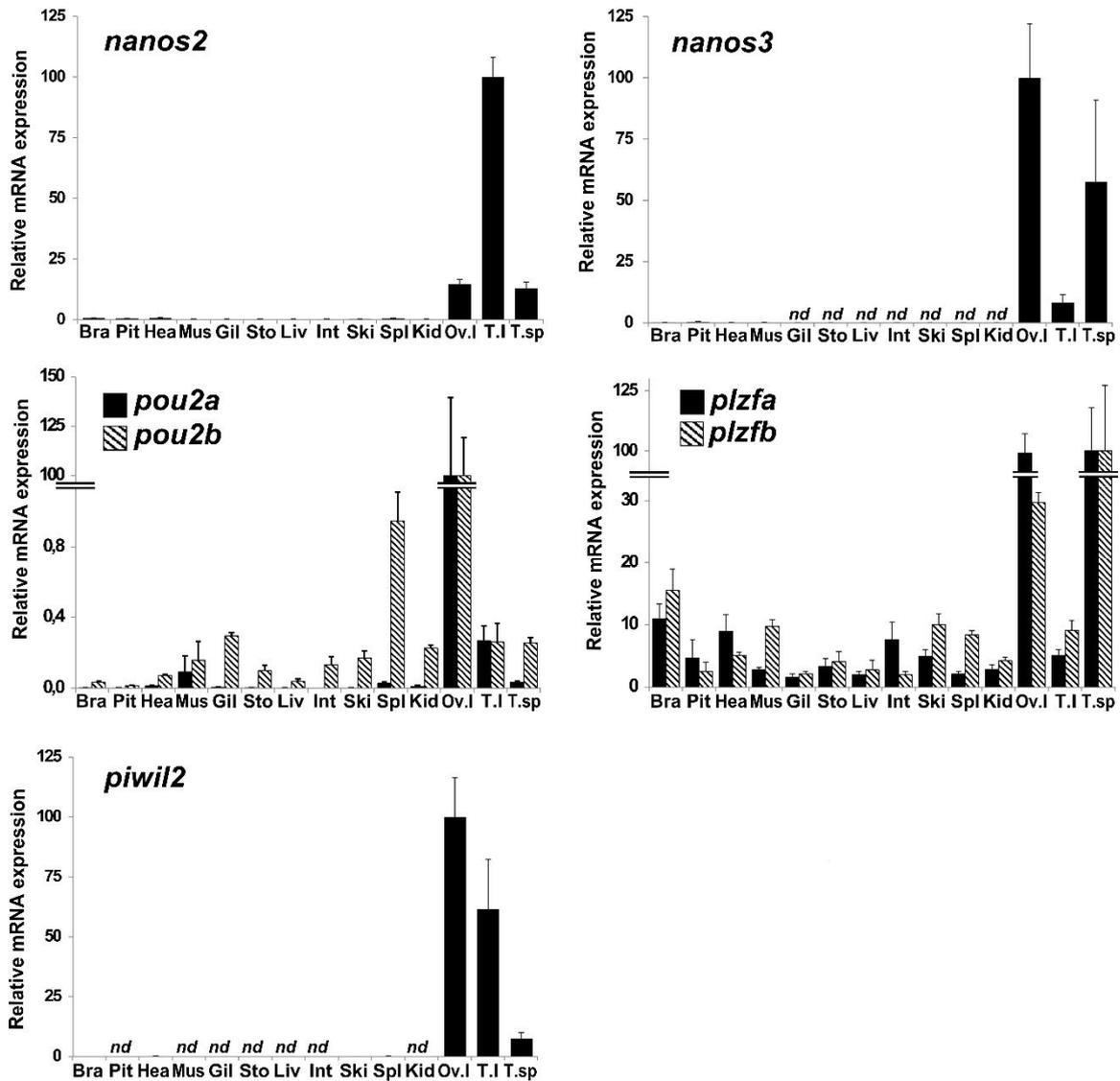
---

The temporal expression pattern of the candidate genes was further studied in whole testicular tissue during the reproductive cycle (Fig. 4). With the exception of *plzfb*, all candidate markers of early germ cells displayed their highest transcript expression levels in the pre-pubertal testis (one year old) when undifferentiated A-spermatogonia (und-Aspg) are the only germ cells observed and account for a large proportion of the total cells present in the immature gonad. The relative expression levels of the transcripts decreased after entry into active spermatogonial proliferation and differentiation of B spermatogonia (stage III) until the end of spermatogonial proliferation (stage V-VI). In contrast, during testis development the expression of *dazl*, an intrinsic meiotic competence factor [46], increased from stage II to stages V-VI, reflecting the growing proportion of differentiated mitotic germ cells (Fig. 4). Interestingly, *nanos3* and *plzfb* transcript expression increased again towards the end of the cycle, and expression levels were highest at the spawning stage. Note that *plzfa* and *pou2a* profiles were similar to *plzfb* and *pou2b* respectively (supplemental Fig. 2).

Moreover, isolated testicular cell fractions enriched in specific germ cells were obtained as described in Material and Methods. Centrifugal elutriation resulted in the following populations (Fig. 5): A spermatogonia populations contained more than 90% of undifferentiated A-Spg when using immature testes, or more than 70% when using maturing testes. B spermatogonia enriched populations contained 70% of B spermatogonia, while the spermatocyte enriched population contained  $\geq 70\%$  primary spermatocytes, contaminated with some B spermatogonia and secondary spermatocytes and the post-meiotic enriched fraction contained essentially secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa. Gene expression was analyzed in these populations (Fig. 6). Candidates *nanos2* and *3*, *pou2* and *plzf* were found preferentially expressed in the undifferentiated A-Spg fraction isolated from juveniles and to a lesser extent in A-Spg isolated from the maturing testis. In contrast, *dazl* was strongly expressed in all trout spermatogenic cell types.

### **Functional testing of isolated germ cell population by transplantation into embryo**

In order to challenge its ‘stemness’, we tested the ability of the fraction of undifferentiated A spermatogonia showing the highest relative expression for our markers (*pou2a* and *b*, *plzfa* and *b*, *nanos2*, *nanos3*) to colonize and survive into a recipient testis. Cells were isolated from heterozygous transgenic trout expressing GFP in the muscle under the control of the *myosin light chain-2* promoter (*mlc2::GFP*), then were transplanted into the peritoneal cavity of a peri-hatching embryo. The donor cell colonization of the recipient gonad was detectable by transgene PCR and the transmission of the transgene to the recipient’s offspring was detectable



**Figure 3:** (Figure 14)

### Expression of candidate SSCs or progenitor markers in rainbow trout adult tissues

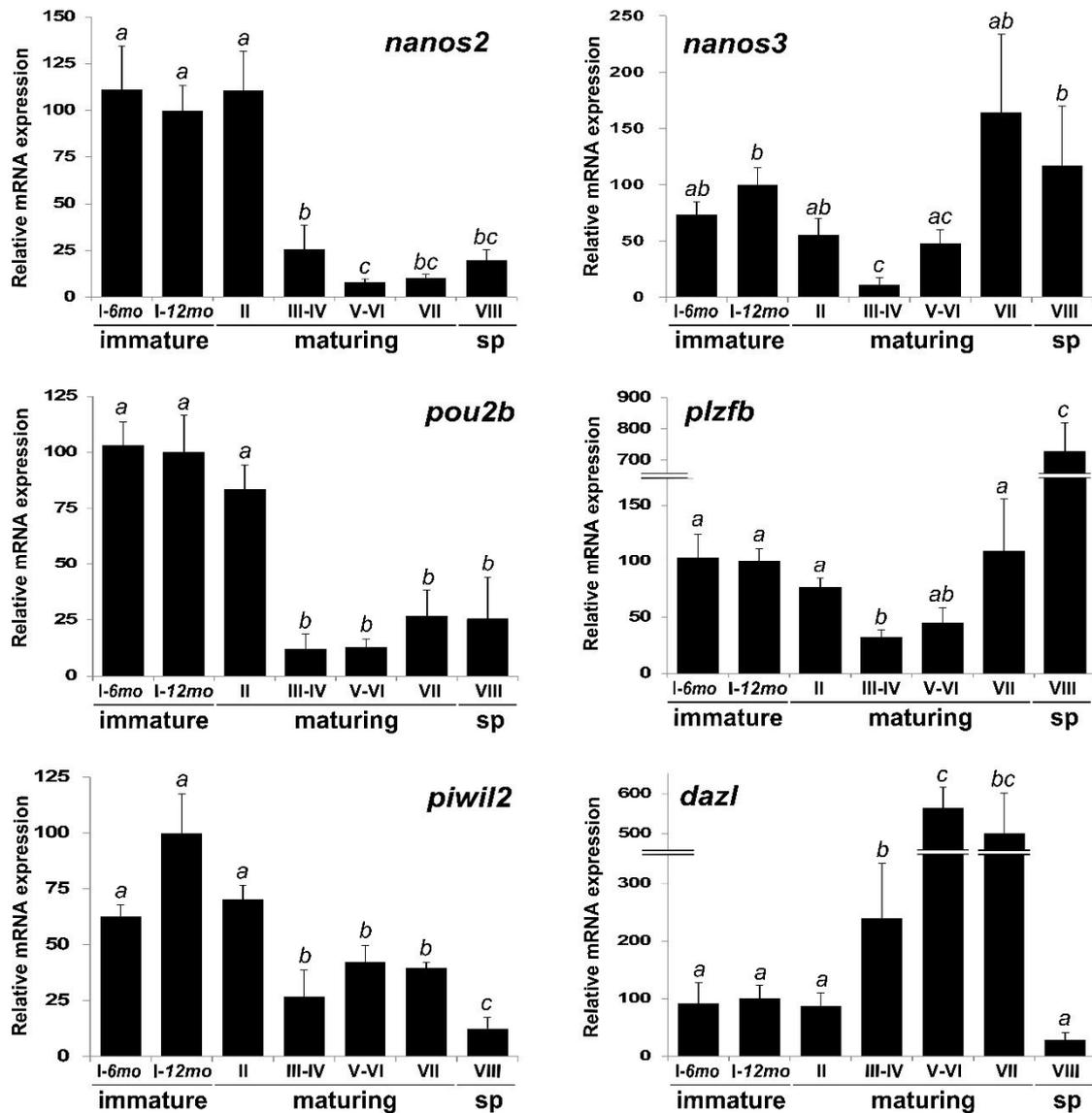
Real-time PCR analysis was conducted using total RNA from the following tissues: brain (Bra), pituitary (Pit), Heart (Hea), muscle (Mus), gill (Gil), stomach (Sto), liver (Liv), intestine (Int), skin (Ski), spleen (Spl), kidney (Kid), pre-vitellogenesis ovary (Ov.I), one year old immature testis (T.I) and spawning testis (T.sp). Gene expression level was normalized by *18s* gene expression and highest tissue expression was arbitrarily set to 100. Mean and sem are shown (n=3/tissue), nd = not detected.

---

by the observation of GFP in the embryo's muscle.

PCR detection of the transgene in recipient testes six months after the transplantation with undifferentiated A spermatogonia isolated from juvenile testis identified 9 gonads containing transgenic cells out of a total of 10 transplanted males (Fig. 7A). One year later, when transplanted males produced mature sperm, we looked for transmission of the transgene into the offspring of recipients, and 400 fertilized eggs were examined per sperm tested. In this technique of transplantation, the recipients are not sterile and the spermatozoa produced from the transplanted cells are in competition with the 'endogenous' gametes. Yet, transgenic embryos showing GFP expression in the muscle were detected in the offspring of 90% (n=30) of the fish transplanted with und-ASpg from juveniles (Fig. 7B,C) revealing the high efficiency of this germ cell population to participate in spermatogenesis of transplanted embryos. Control sperm from the transgenic line produced 50% of GFP positive offspring. High individual variation of the transgene transmission rate was observed between transplanted fish (0.5 to 28% of the offspring as shown in Figure 7C). Such variation in the proportion of transgenic offspring per individual transmitting recipient probably reveals variability in the technical act of transplantation. The presence of the transgene was also searched by PCR in the sperm and in 3 other organs of 5 transmitting males (Fig. 7D). While their sperm was positive, the transgene could not be detected in muscle or in other organs located in the peritoneal cavity such as the liver and the intestine. These results demonstrate that the undifferentiated A spermatogonia in the immature testis include a population of spermatogonial stem cells able to colonize, specifically, the testis at a high rate and to differentiate to produce functional gametes.

Our data showed that similar results were obtained whether we measured the rate of transgene transmission into the offspring or the transgene detection by PCR in the 6 month old gonad. Therefore we chose this second method to estimate the transplantation efficiency in the following experiments. As indicated in figure 7E, a high level of positive detection of the transgene (78% +/-7%; n=4 experiments) was confirmed when transplanting undifferentiated A spermatogonia isolated from stage I immature testis. In one independent experiment, the 'stemness' capacity of A spermatogonia versus the B spermatogonia isolated by centrifugal elutriation from stage IV testes was compared (Fig. 7F). While isolated A-Spg were able to colonize 42% of the recipient gonads (n=20 fish), transplantation efficiency using the differentiated B-Spg was reduced by approximately 4-fold (n=20 fish). Those results confirmed that at least some A undifferentiated spermatogonia in both immature and mature testes possess spermatogonial stem cell functionality.



**Figure 4:** (Figure 15)

### Expression of candidate SSCs or progenitor markers during trout testis development

Expression profiles were monitored by real-time qPCR in trout testicular samples ordered according to the natural time course of spermatogenetic development (see Fig. 1): immature (6 months and one year old), maturing (from stage II to stage VII) and spawning (sp, stage VIII). Gene expression level was normalized by *rs15* gene expression and one year old immature testis expression was arbitrarily set to 100 for each gene studied. Mean and sem are shown (n=4-5). Different letters indicate significantly different levels of expression at p<0,05.

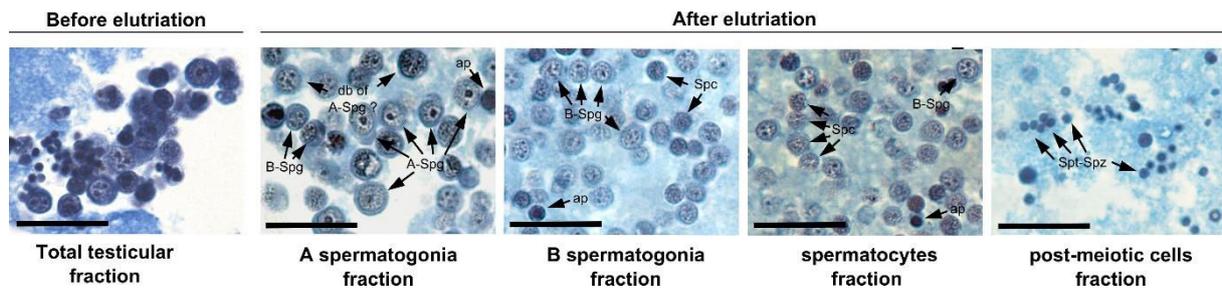
---

## Cellular localization of the candidate spermatogonial stem cell markers

An initial experiment of in situ RNA hybridization on sections of testes at stage IV of spermatogenic development, when all the germ cell types are present, allowed us to further localize the expression of some of the genes (supplemental Fig. 3). While *vasa* expression extended to all A and B spermatogonia and *dazl* was expressed in all germ cells, *piwil2* expression was restricted to all A spermatogonia and early B spermatogonia (to 4 cells in a cyst). *pou2* and *nanos3* transcript expression were low in PCR analysis and no specific labeling could be clearly demonstrated by ISH. More interestingly, *nanos2* was found preferentially and strongly expressed in a sub-population of A spermatogonia.

A detailed ISH study was therefore conducted on the localization of the transcript expression of *nanos2* throughout testis development and during the spermatogenetic cycle in comparison to *vasa* expression (Fig. 8). Expression of *nanos2* was already detected in the germ cells soon after testis differentiation in 65dpf embryo (Fig. 8A). In the juvenile testis, while *vasa* (Fig. 8B) and *piwil2* (not shown) were expressed in all A spermatogonia, *nanos2* detection was restricted to a sub-population of the undifferentiated A spermatogonia. Counting the total A spermatogonia (using morphological criteria) and the A-Spg labeled with the *nanos2* probe (two independent experiments) allowed us to estimate that less than 20% (17% and 19%) of the spermatogonia expressed *nanos2* transcript.. By contrast, *nanos2* expression was detected in all the scattered and inactive A spermatogonia remaining in the testis of spawning male trout. Interestingly, the sub-population of *nanos2* positive cells consist of isolated and doublet of spermatogonia (Fig. 8B). Note that expression of the *nanos2* transcript was also detected over the background signal in oogonia or early pre-vitellogenic oocytes in the ovary (supplemental Fig. 4). Such detection of *nanos2* restricted to a sub-population of undifferentiated spermatogonia supports its selectivity as a marker of spermatogonial stem cells.

Finally, to analyze the cellular expression of one other important candidate gene, *plzf*, we took advantage of a heterologous anti-Plzf antibody targeting a conserved epitope between mouse and the predicted protein in rainbow trout. Binding of the antibody to the trout Plzf proteins was attested by western blot experiments (supplemental Fig. 5). Using immunohistochemistry, Plzf labeling was weakly detected in the cytoplasm of undifferentiated A spermatogonia in immature testis sections and in both the cytoplasm and the nucleus of some A spermatogonia in stage IV. At the spawning stage, protein expression was preferentially detected in the nuclei of all undifferentiated A spermatogonia but also in some peritubular cells and related to high transcript expression in PCR at this particular stage (Fig. 9). Still, apart from the somatic cells,



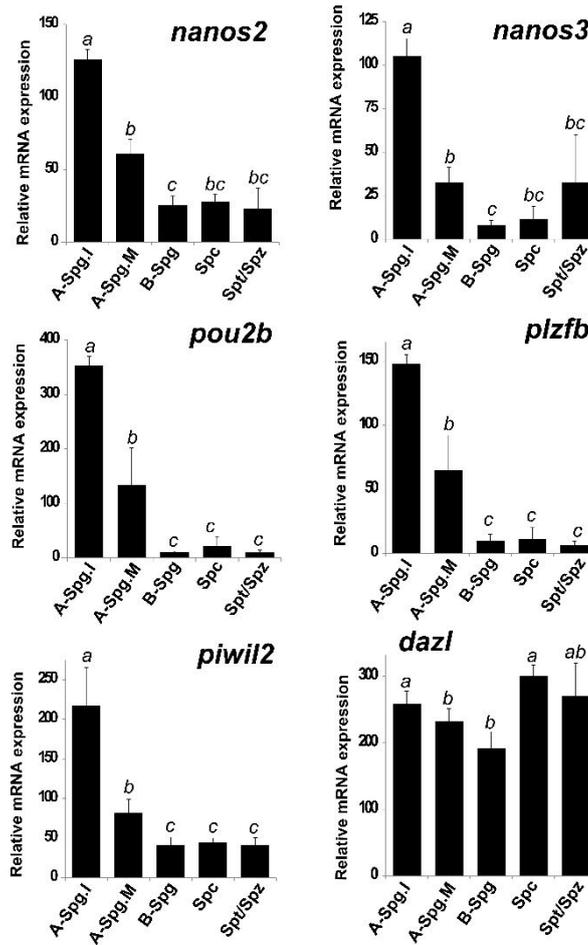
**Figure 5:** (Figure 16)

### Light microscopy observations of germ cells enriched fractions sorted by centrifugal elutriation

Histological sections of gelose embedded testicular cell fractions from maturing testis and sorted by centrifugal elutriation. A Spermatogonia populations contained more than 90% of A-Spg using immature testes and more than 70% using maturing testes. B spermatogonia enriched population contains 70% B spermatogonia (B-Spg). Spermatocyte enriched population contained ~70% primary spermatocytes (Spc), contaminated with some B spermatogonia and secondary spermatocytes. Post-meiotic enriched samples contained ~90% haploid cells (spermatids: Spt; spermatozoa: Spz). Probable doublet of A spermatogonia (db of A-Spg) are seen in the A spermatogonia fraction. Depending on the experiment, we observe sometimes apoptotic (ap) cells in the elutriation fractions. Scale bar = 25µm. Staining: Regaud Haematoxylin-Orange G-Aniline blue.

---

Plzf is expressed in some undifferentiated A-Spg from immature testes and in maturing testis and in all undifferentiated A-Spg from spawning testis, thus strongly suggests that these cells harbor the most immature spermatogonia.



**Figure 6:** (Figure 17)

### Germ cell expression of candidate SSCs or progenitor markers

Expression profiles were monitored by real-time qPCR in trout testicular cell fraction sorted by centrifugal elutriation; undifferentiated A spermatogonia from immature testis (A-Spg.I), A spermatogonia from adult testis (A-Spg.M), B spermatogonia (B-Spg), spermatocytes (Spc) and post-meiotic germ cells (Spt/Spz). Relative transcript enrichment is represented as indicated in Material and Methods. Mean and sem are shown (n=3-4). Different letters indicate significantly different levels of expression at  $p < 0.05$ .

---

## ***Discussion***

### **The trout, a model to study SSCs**

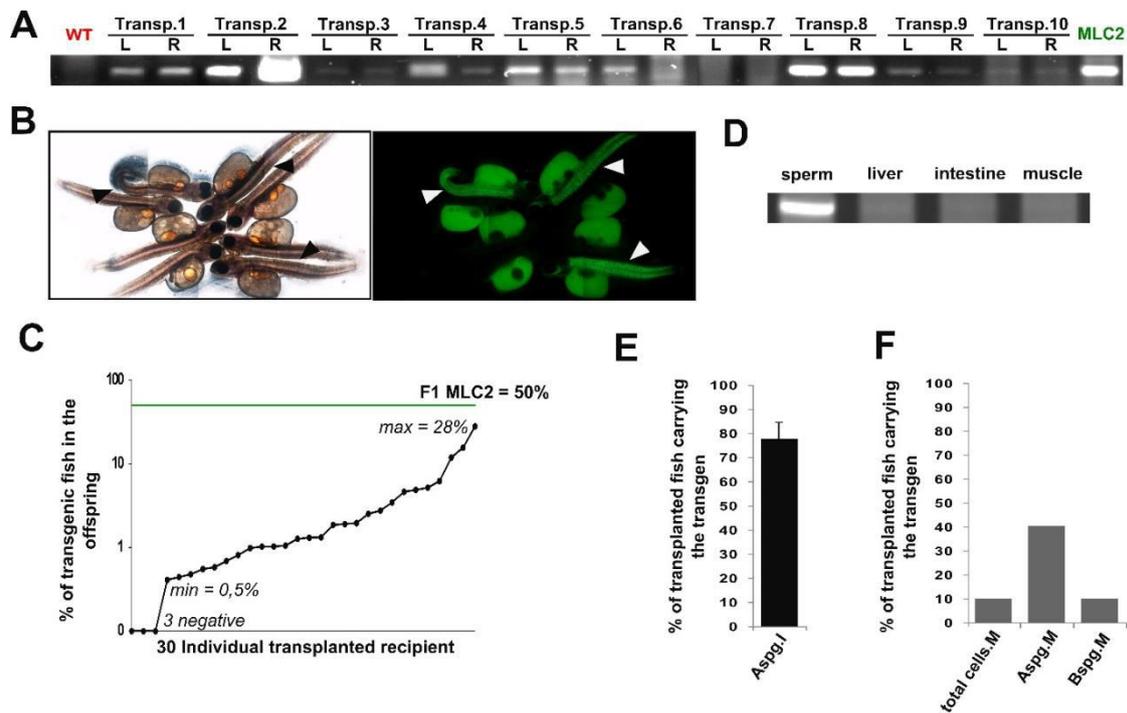
Spermatogonial stem cells are adult germline stem cells that can both self-renew or differentiate into more advanced germ cells. Even though ultrastructure and the specific localization of these cells in the seminiferous tubules and gene expression have been vastly studied in mammalian species, there is still debate on the identification of the true spermatogonial stem cells [3, 4, 47]. The objectives of our study were to take advantage of the organization of spermatogenesis in the trout to identify the spermatogonial stem cell population on a morphological, molecular and functional level in fish.

Indeed, rainbow trout emerge as a very appropriate model. In this species spermatogenesis is strongly governed by seasonality, so that throughout juvenile development and in the early stage of each cycle (stage I), only undifferentiated A spermatogonia are present in the seminiferous tubules. Then at the end of one reproductive cycle (spawning, stage VIII) only few scattered and slowly dividing A spermatogonia remain along the tubular wall. As these few cells will support the production of large numbers of spermatozoa in the next round of spermatogenesis, we postulate they are the true adult stem cells. One other interesting characteristic of the high seasonality is that spermatogenesis is partially synchronous in the whole testis and therefore gene expression at specific stages of the cycle can be related to specific aspects of the spermatogenetic development.

### **Identification of isolated and doublet of undifferentiated A spermatogonia**

In all three stages considered (immature stage I, maturing stage IV, and spawning stage VIII), we identified isolated large germ cells with a clear cytoplasm presenting nuage and/or cement structures associated with numerous round mitochondria, which are typical morphological characteristics shared with spermatogonial stem cells described in other vertebrates [2, 48-51]. These cells are enclosed by one to three Sertoli cells and are localized close to the tubular wall. The frequent observation of gap junctions between these germ cells and their supporting somatic cells prove active communication with their local environment. Due to this cystic organization, spermatogonial stem cells are not directly in contact and anchored onto the basal lamina, contrary to what is observed in mammalian testis. This characteristic could imply other ways of regulation of the spermatogonial stem cell fate by their microenvironment.

Previous studies in mouse spermatogenesis and other developmental systems indicated preferential localization of stem cells next to the interstitium or next to the blood vessels,



**Figure 7:** (Figure 18)

### Transplantation of isolated populations of rainbow trout spermatogonia purified by centrifugal elutriation

Undifferentiated A spermatogonia isolated from juvenile transgenic trout expressing GFP in the muscle under the control of the *myosin light chain-2* promoter (*mlc2::GFP*) were transplanted into the peritoneal cavity of peri-hatching embryos.

**A.** PCR allowed the detection of the transgene in testicular DNA in 6 month old transplanted fish. Various amounts of transgene was detected in transplanted recipient testis (Transp.1 to Transp.10) and between left (L) and right (R) gonad. Lane WT and MLC2 contain DNA extracted from untransplanted controls and transgenic F1 MLC2 fish, respectively.

**B.** Fertilization of wild type oocytes with sperm from one year old mature transplanted recipients led to the detection of transgenic embryos (arrow, GFP expression under *mlc2* promoter in the tail) in the resulting offspring.

**C.** Percentage of transgenic fish in the offspring of transplanted recipients. Sperm from 30 mature recipients were used to fertilize 400 eggs each and the number of transgenic offspring was counted. In 30 fish, 3 didn't produce transgenic offspring and 27 produced from 0.5% to 28% transgenic embryos. By comparison, offspring of heterozygous F1 males from the *mlc2::GFP* line produced 50% positive embryos.

**D.** Transgene was detected in the sperm of transmitting recipient but could not be detected in other tissues (liver, intestine, muscle) by PCR (n=5).

**E.** Percentage of fish carrying the transgene 6 months after transplantation of undifferentiated A spermatogonia from immature testis (4 experiments, n=30-90 transplanted fish/experiment).

**F.** Percentage of recipient fish carrying the transgene in the gonad 6 months after transplantation of total cells, A spermatogonia, and B spermatogonia isolated from a mature testis (stage II- III) in one preliminary experiment (n=20 fish per condition).

---

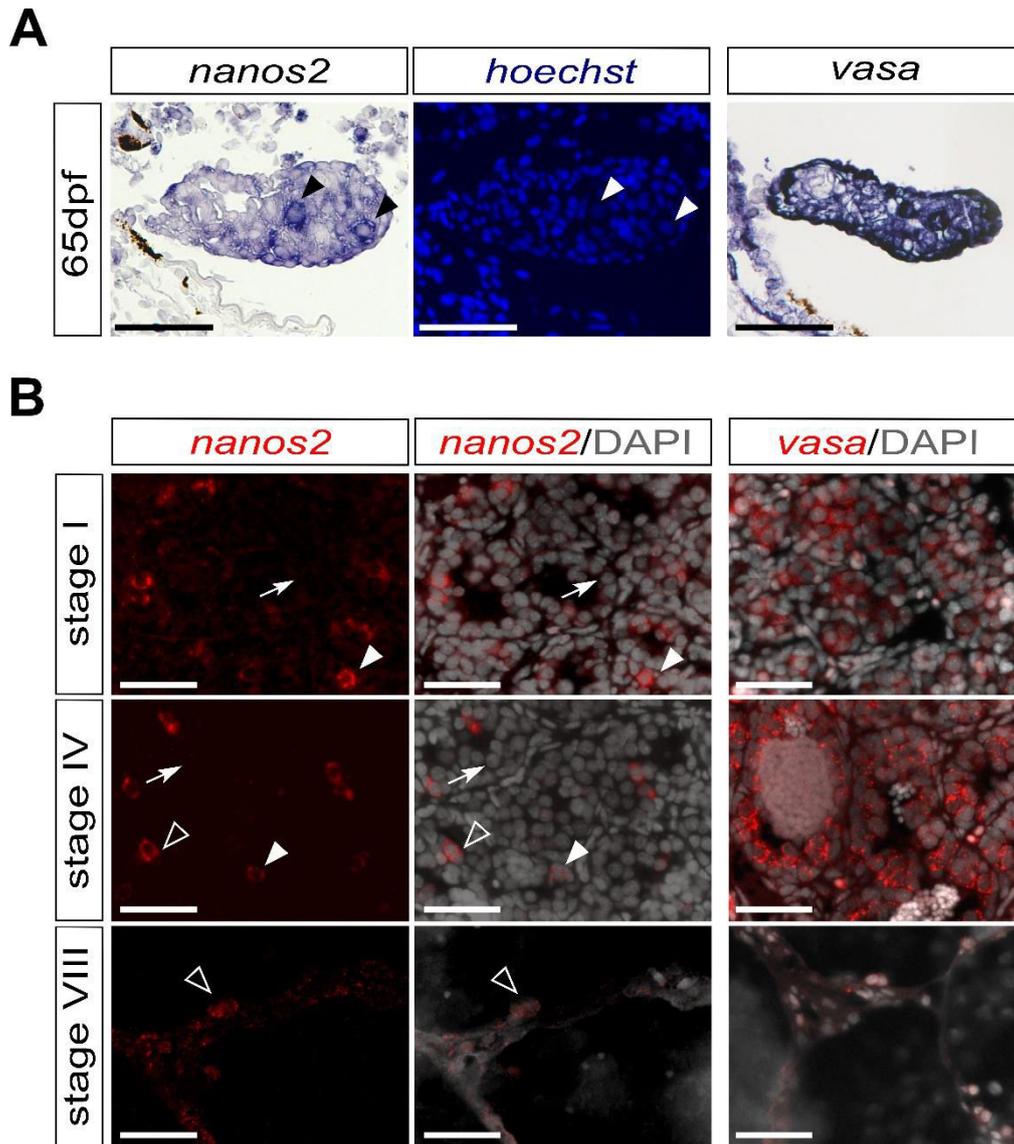
suggesting an involvement of endothelial cells in regulating stem cells [47, 52, 53]. In the zebrafish, the preferential localization of SSCs candidates close to the blood vessels of the interstitium was also observed [9]. However, this couldn't be confirmed in trout, as we observed undifferentiated germ cells with subcellular SSCs characteristics in various localizations along the tubular wall. Further investigation including the localization of large numbers of A spermatogonia may be needed to quantitatively address this point.

A striking piece of information resulting from our observation is the frequent occurrence of clusters of two cells with spermatogonial stem cell characteristics, both in maturing and spawning stages. The question aroused as whether these cells may be the counterpart of the A paired population observed in the mouse model. In zebrafish, Leal et al. [50] detected clusters of two early spermatogonial cells linked by cytoplasmic bridges, one considered as the undifferentiated spermatogonial stem cells, the other possibly engaged spermatogonia with different morphological characteristics. In contrast, in our study, the two cells identified in these clusters were strictly identical, harboring junctions between each other's cytoplasmic membranes while no cytoplasmic bridges were observed and therefore we do not exclude that this could represent spermatogonial stem cell self-renewal.

Interestingly, at least one characteristic differed among the probable spermatogonial stem cells identified along the testicular development. Indeed, when comparing stages I, IV and VIII, the more the stage of development was advanced, the less heterochromatin was noticeable in the nucleus of the putative SSCs. This supports the idea of trout SSCs heterogeneity between the juvenile and the spawning stage. Chromatin density was also reported as a marker of differentiation of the spermatogonia in rodent [47, 49] and dogfish SSCs [54]. So, low heterochromatin in undifferentiated A-Spg at the spawning stage further supports the assumption that these cells are inactive spermatogonial stem cells while the juvenile stem cells would be involved in the constitution of stocks of undifferentiated germ cells ready to engage in active spermatogenesis. These different states possibly reflect different regulation in each spermatogenetic stage of the spermatogonial stem cell commitment to self-renewal or to differentiation into engaged spermatogonia.

### **Rainbow trout A spermatogonia express homologs of mammalian markers of spermatogonial stem cells**

The present study provides, for the first time, expression profiles of potential markers of undifferentiated spermatogonia in fish throughout testis development and in isolated specific germ cell sub-populations. Indeed, the trout orthologs of *piwil2*, *pou2* (teleost homolog of



**Figure 8:** (Figure 19)

**Localization of *nanos2* transcript from 65 dpf juvenile until the spawning stage**

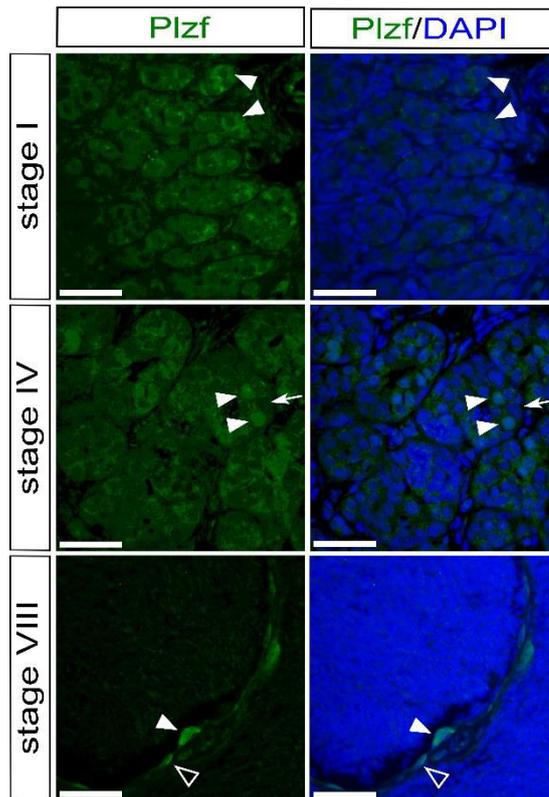
**A.** Sections of testis after whole mount *in situ* hybridization of 65 dpf embryo with *nanos2* or *vasa* probe. Positively stained spermatogonia for *nanos2* are indicated by an arrowhead. Scale bar = 50 $\mu$ m

**B.** *In situ* hybridization of *nanos2* and *vasa* transcript in immature (stage I), maturing (stage IV) and spawning (stage VIII) testes. Positive staining for *nanos2* was observed in isolated (arrowhead) and pairs of spermatogonia (empty arrowhead) representing less than 20% of the A spermatogonia present in stage I and stage IV testis and in all undifferentiated A spermatogonia in the spawning testis. Negatively stained spermatogonia is indicated by an arrow. Scale bar = 50 $\mu$ m

---

*Pou5f1/Oct4*), *nanos2* and *nanos3*, and *plzf*, known markers of the early germ cells in mouse, are also expressed preferentially in the A spermatogonia fraction isolated from immature and from adult rainbow trout, and are downregulated after spermatogonia differentiation. For these transcripts, high level of expression is detected in the immature pre-pubertal testis stage where A spermatogonia are the only germ cells present and proliferate slowly.

Concerning *piwil2*, a nuage component essential for self-renewal and differentiation of germline stem cells [55], we detected here its transcript in all trout A-Spg and early B spermatogonia specifying its expression compared to a previous report [14]. So, *piwil2* may be a marker of the A spermatogonia population, but would not allow spermatogonial stem cells to be identified. PLZF is an intrinsic repressor of differentiation of the spermatogonial stem cells in mouse [17, 18]. In our study, its transcript presented an interesting overexpression in A-Spg, and immunohistochemistry revealed high expression of the protein in undifferentiated A spermatogonia present in juvenile, and in some spermatogonia present in maturing stages. Accordingly, those results imply that as in the mouse, Plzf identifies the trout most undifferentiated A spermatogonia. The staining appeared cytoplasmic in most labelled A-Spg in the juvenile trout. This contrasts with the fact that in rodents and zebrafish Plzf has been reported as preferentially observed in the nucleus of undifferentiated spermatogonia [17, 18, 56], although cytoplasmic localization in SSCs has also been detected in mouse [31, Allemand I, unpublished data]. Unfortunately no counting of the positive nuclei or cytoplasm was performed in the juvenile testis and we cannot comment on how Plzf expression or localization compare with *nanos2* positive cells at that stage. However, Plzf immuno-detection in the nucleus of undifferentiated germ cells of the spawning testes reinforces the hypothesis that Plzf labels putative SSCs in trout. In zebrafish testis, detection of this protein extended to cysts of 8B spermatogonia clone [56], weakening the potential of *plzf* as an exclusive marker of undifferentiated spermatogonia in all teleost species. Besides, we also find Plzf expression in another cellular type located on the tubular wall. In seasonal fish like rainbow trout, not only germ cells but also other cell types proliferate to replenish the set of cells needed for a new round of spermatogenesis [39]. PLZF is known to regulate progenitor maintenance in multiple tissues [57], as supported in rainbow trout by the broad expression in a wide variety of tissues observed in this study, and therefore it could play a role in several testicular lineages. Finally, *pou2* and *nanos3*, are both regarded as primordial germ cell and spermatogonial stem cells markers in vertebrates [28, 29, 58, 59]. Both were preferentially detected in the most undifferentiated germ cell fractions in trout, however their expression measured by qPCR was relatively low consistent with a lack of signals by in situ hybridization.



**Figure 9:** (Figure 20)

### Immunodetection of Plzf protein

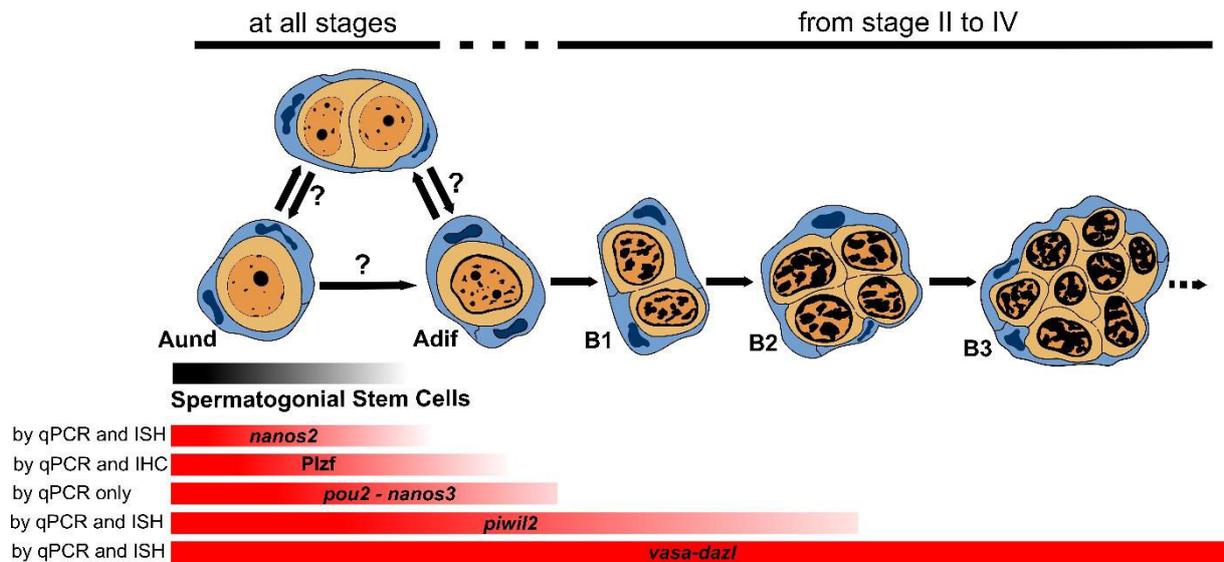
Immunohistochemistry of Plzf protein in immature (stage I), maturing (stage IV) and spawning (stage VIII) testis sections. Positive staining is observed, mostly in the cytoplasm of undifferentiated A spermatogonia in immature testes. In stage IV testis, positive staining is observed in the nucleus of some undifferentiated A spermatogonia (arrowhead, arrow indicate negative A spermatogonia). Two populations are stained in the spawning testis, undifferentiated A spermatogonia (arrowhead) and peritubular somatic cells (empty arrowhead). Scale bar = 50 $\mu$ m.

---

## ***nanos2*, a marker of a sub-population of undifferentiated A spermatogonia**

*Nanos* genes are expressed in germ cell lineage in metazoans, from cnidarian [60], nematode [61], and arthropod [26] to the vertebrate lineage with the appearance of three members of this family [28]: *Nanos1* expressed in the brain [62], *Nanos2* and *Nanos3* expressed in germinal stem cells [29]. Unlike the restricted expression of *Nanos2* in the adult male gonad in mammals, in rainbow trout, *nanos2* expression was found in early germ cells from a 65dpf testis but also in oogonia in the developed ovary. Those results are consistent with recent observation of *nanos2* expression in the early germ cells of the zebrafish [32] and medaka [28]. More specifically in medaka, it is detected in a subset of pre-meiotic oogonia in the adult gonad that are proposed as the ovarian germ stem cells [33].

The trout homolog of *nanos2* was found preferentially expressed in the juvenile and pre-pubertal testis that contain only undifferentiated A-Spg and this expression decreased during spermatogenetic development which was inversely related to meiotic differentiation and to *dazl* expression. This fits the fact that in mouse NANOS2 represses the translation of *Sycp3*, *Dazl* and *Stra8*, which are essential factors for meiotic differentiation [63]. From the expression profile in isolated germ cell populations, we can conclude that *nanos2* is expressed by the undifferentiated A-Spg. Moreover, we show by in situ hybridization, that *nanos2* is in fact expressed by a subset of isolated or by two closely associated A-Spg in the immature and maturing testis. In contrast, study on the tilapia fish showed expression of Nanos2 from isolated A spermatogonia to cysts of 8 differentiated cells [64]. This last study detected the Nanos protein with a heterologous antibody directed against the C-terminal region of human NANOS2, a region of high conservation among the NANOS family, and the possibility that the signal also revealed other Nanos was not ruled out. Furthermore, it is possible that Nanos2 protein half-life allows the detection of the protein in later stages compared to the transcript expression. However, in rainbow trout, we also detected *nanos2* transcript expression in all the rare and inactive A-spermatogonia found along the seminiferous tubule wall in the spawning testis. This last population being regarded as true SSC remaining in the tubule when spermatogenesis is arrested between two spermatogenic cycles and based on our other observations, we propose that *nanos2* positive cells are the putative spermatogonial stem cells in rainbow trout.



**Figure 10:** (Figure 21)

### Proposed model for spermatogonia populations of the trout

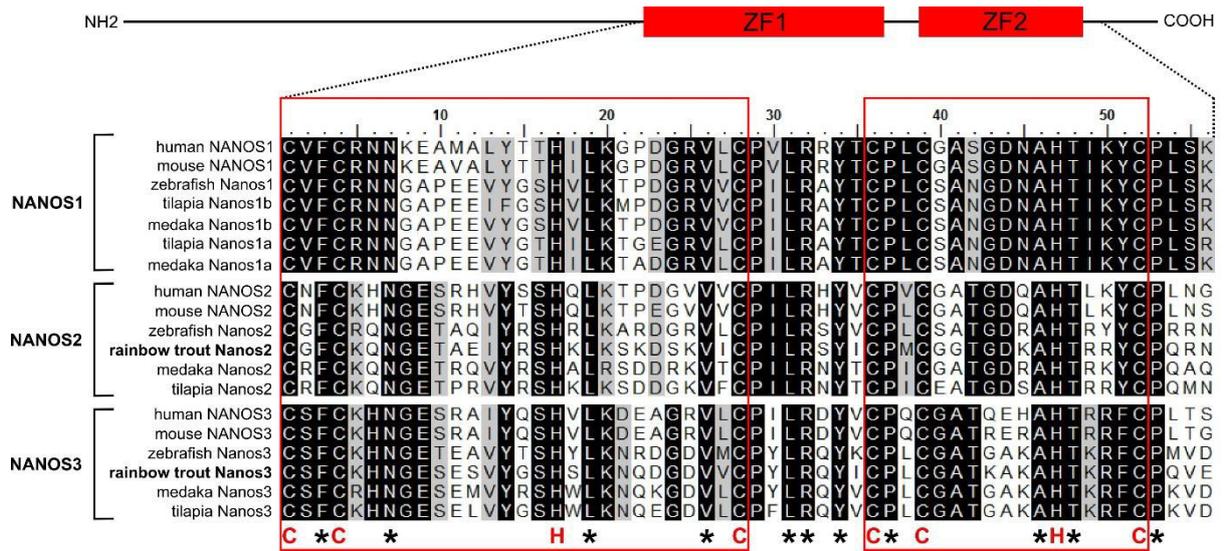
From morphological observations, we characterized undifferentiated A spermatogonia population (isolated and doublet of spermatogonia) in pre-pubertal, maturing and spawning rainbow trout testis. Chromatin density increased in the nucleus with spermatogonial differentiation. Undifferentiated A spermatogonia express the homologs of mammalian spermatogonial stem cell markers, *nanos2* and *nanos3*, *pou2*, *piwil2* and *plzf*. In particular, *nanos2* transcript is expressed by a sub-population of these cells, isolated or in doublet. We propose that undifferentiated A-Spg *nanos2* positive are putative spermatogonial stem cells.

---

## **Transplanted undifferentiated A spermatogonia colonize the recipient gonad and produce functional gametes**

To test the spermatogonial stem cell functional aptitude to colonize and differentiate into mature gametes, we transplanted isolated testicular populations of cells into pre-hatching male trout embryos. Transplantation of trout spermatogonia carrying the *mlc2::GFP* transgene enabled us to detect the transgene in the juvenile testis of recipients, indicating that at least some of the cells were able to migrate and colonize the gonad [44]. Transmission of the transgene to the recipient's offspring demonstrated that spermatogonial fractions contain cells able to proliferate and differentiate into functional spermatozoa, as initially found by Yoshizaki's team [11]. Here we show that the transplantation of undifferentiated A-Spg populations from immature males, presenting the highest *pou2*, *nanos3*, *nanos2*, *plzf* and *piwil2* transcript expression, resulted in a very high proportion (>75%, n=4) of recipients carrying the transgene. Moreover, A-spermatogonia from maturing testis isolated by centrifugal elutriation were also able to colonize and proliferate in the surrogate recipient. In comparison, the rate of colonization was greatly diminished by transplanting the fraction containing essentially B-Spg, which clearly shows for the first time in fish that the stem capacity of germ cells is lost after commitment into spermatogenesis maturation. However this is a preliminary experiment and the fact that the colonization efficiency was not reduced to 0 for this B spermatogonia fraction is unexpected as we cannot rule out a contamination of the B-Spg sorted fraction with some spermatogonial stem cells. Finally it would be pertinent to compare the 'stemness' potency of undifferentiated A-Spg isolated from spawning males, since many arguments point to these cells as true adult stem cells. Our attempts to isolate these cells, then purify them by centrifugal elutriation so far has not allowed the production of enough cells to transplant, due to the relative paucity of these cells and to the presence of spermatozoa in huge numbers.

In conclusion, morphological observations allowed us to characterize the undifferentiated A spermatogonia population (isolated and doublet of spermatogonia) in pre-pubertal, maturing and spawning rainbow trout testis. These cells purified by centrifugal elutriation express *piwil2* and the homologs of mammalian spermatogonial stem/progenitor cell markers, *nanos2* and *nanos3*, *pou2*, and *plzf*. Those observations allowed us to propose a model of early stages of germ cell differentiation and of marker expression in the trout testis (Fig. 10). As indicated by transplantation assays, the undifferentiated spermatogonial cells from immature and mature testes present high 'stemness' efficiency in terms of migration into the recipient gonad and differentiation to give functional gametes. Finally, we propose that undifferentiated A-Spg



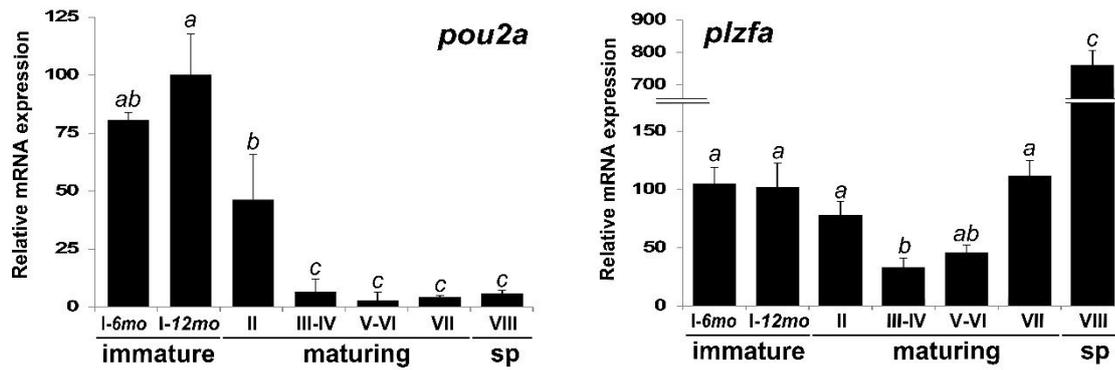
**Supplemental Figure 1:** (Figure 22)

### C-terminal alignment of the NANOS protein family

The C-terminal domain of the predicted vertebrate NANOS proteins was aligned using the clustalW program of the BioEdit software. Two zinc finger domains (CCHC; boxes ZF1 and ZF2) are localized in the C-terminal domain and are characteristics of the NANOS family. Other conserved amino acids motifs are observed for all Nanos protein subfamilies (asterisks). Interestingly, note that all teleostean NANOS2 proteins share specific conserved amino acids motifs with their mammalian counterparts (black shading). Sequences used for this alignment were obtained from NCBI database : human (*Homo sapiens*): NANOS1 (NP\_955631), NANOS2 (NP\_001025032), NANOS3 (NP\_001092092); mouse (*Mus musculus*): NANOS1 (NP\_848508), NANOS2 (NP\_918953), NANOS3 (NP\_918948); zebrafish (*Danio rerio*): Nanos1 (XP\_003199884), Nanos2 (XP\_00516868), Nanos3 (NP\_571953); tilapia (*Oreochromis niloticus*): Nanos1a (XP\_003447814), Nanos1b (XP\_005467279), Nanos2 (XP\_005448912), Nanos3 (XP\_005460610); medaka (*Oryzias latipes*): Nanos1a (NP\_001116380), Nanos1b (NP\_001153941), Nanos2 (NP\_001153919), Nanos3 (NP\_001116300); rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Nanos2 (KJ123762), Nanos3 (AB787269).

---

remaining in the spawning testis, which are *nanos2* and Plzf positive at the transcriptional level, are SSCs, and we hypothesize that in the juvenile and in the maturing trout testis, only the subset of und A-Spg that express *nanos2* transcript are spermatogonial stem cells. We expect that the *nanos2* transcript will be a useful marker to further study these cells in vivo and in vitro and to investigate the regulation of their fate towards self-renewal or differentiation.



**Supplemental Figure 2:** (Figure 23)

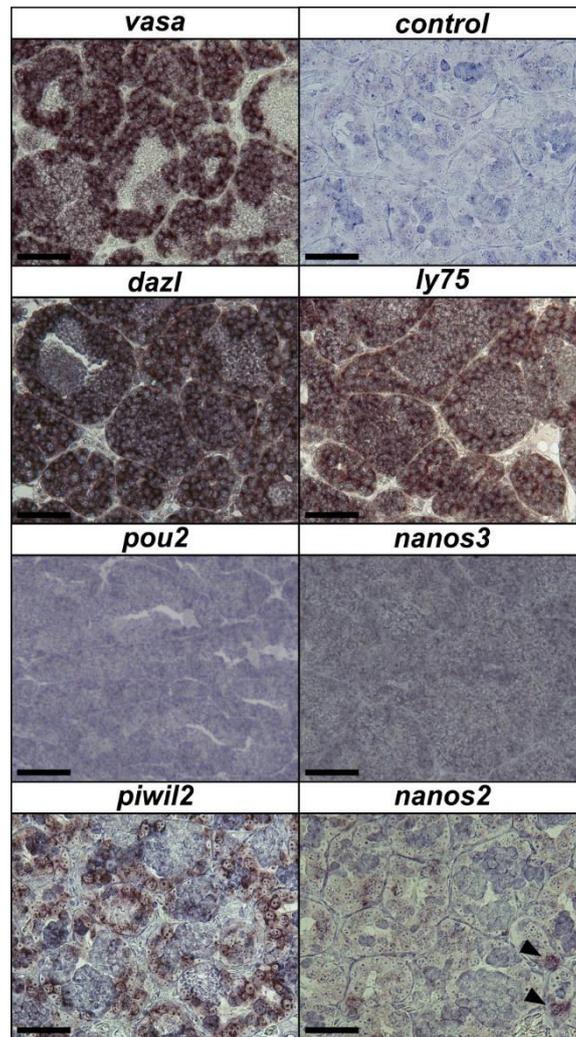
### Expression of *plzfa* and *pou2a* during trout testis development

Expression profiles were monitored by real-time qPCR in trout testicular samples ordered according to the natural time course of spermatogenetic development (see Fig. 1): immature (6 months and one year old), maturing (from stage II to stage VII) and spawning (sp, stage VIII). Gene expression level was normalized by *rs15* gene expression and one year old immature testis expression was arbitrarily set to 100 for each gene studied. Mean and sem are shown (n = 4-5). Different letters indicate significantly different levels of expression at  $p < 0,05$ .

---

## *Acknowledgment*

We thank A.S. Goupil for excellent technical assistance. We would also like to thank the team from our laboratory fish rearing facilities, C. Duret and J.L. Thomas, for taking care of the transgenic line and transplanted recipients and from the PEIMA experimental fish farm from INRA for providing the monosexed males embryos. Special thanks to P.Y. Rescan and J.C. Gabillard for the *mlc2::GFP* transgenic line. This research received funding from the French National Research Agency **ANR11 INBS-0003 (CRB ANIM)**. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. JB received a PhD grant from the French Ministry of Research and Technology.



**Supplemental Figure 3:** (Figure 24)

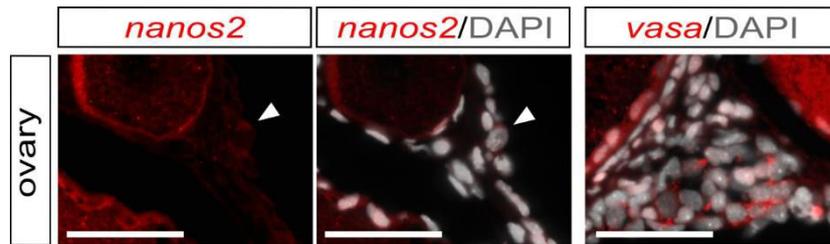
**In situ expression of candidate genes in stage IV (maturing stage) testis sections.**

Testes in stage IV of testicular development were used. At that stage, A spermatogonia are found isolated or in doublets and coexist with cysts of synchronous germ cells at various stages of spermatogenesis, from rapidly dividing B spermatogonia to spermatids. Positive expression of *nanos2* was observed by ISH in some A spermatogonia and is indicated by an arrowhead. No significant and specific signal could be detected with *nanos3* and *pou2*. *Ly75* was expressed in all premeiotic germinal cells, and *dazl* in all germ cells. Control without probe is shown in the top right picture. Scale bar = 50 $\mu$ m.

---

## References

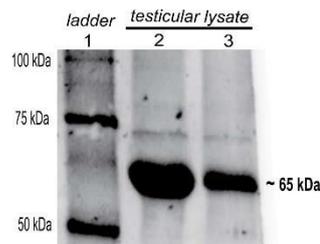
1. Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. *Am J Anat* 1962; 111:111-129.
2. Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 1971; 169:533-557.
3. Chiarini-Garcia H, Russell LD. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod* 2001; 65:1170-1178.
4. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos T Roy Soc B* 2010; 365:1663-1678.
5. Barroca V, Lassalle B, Coureuil M, Louis JP, Le Page F, Testart J, Allemand I, Riou L, Fouchet P. Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo. *Nat Cell Biol* 2009; 11:190-196.
6. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:11298-11302.
7. Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod* 2003; 69:1142-1149.
8. Lacerda SMSN, Batlouni SR, Costa GMJ, Segatelli TM, Quirino BR, Queiroz BM, Kalapothakis E, França LR. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Plos One* 2010; 5.
9. Nóbrega RH, Greebe CD, van de Kant H, Bogerd J, de França LR, Schulz RW. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. *Plos One* 2010; 5.
10. Farlora R, Hattori-Ihara S, Takeuchi Y, Hayashi M, Octavera A, Alimuddin, Alimuddin, Yoshizaki G. Intraperitoneal Germ Cell Transplantation in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mar Biotechnol* 2013.
11. Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Takeuchi T, Yoshizaki G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:2725-2729.
12. Yazawa R, Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Kabeya N, Yoshizaki G. Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells. *Biol Reprod* 2010; 82:896-904.
13. Schulz RW, de França LR, Lareyre J-J, Le Gac F, LeGac F, Chiarini-Garcia H, et al.



**Supplemental Figure 4:** (Figure 25)

***nanos2* expression in some oogonia in the female gonad**

Positive expression of *nanos2* in some trout oogonia from pre-vitellogenic ovary is indicated by an arrowhead. Scale bar = 50 $\mu$ m.



**Supplemental Figure 5:** (Figure 26)

**Detection of Plzf protein by Western Blot experiment**

Western blot analysis in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of two independent testicular cell fractions lysates from immature fish (lanes 2 and 3). Identification of a band of 65kDa corresponding to the predicted molecular weight of the Plzfa rainbow trout protein. Lane 1 corresponds to the ladder.

- 
- Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endo* 2010; 165:390-411.
14. Yano A, Suzuki K, Yoshizaki G. Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biol Reprod* 2008; 78:151-158.
  15. Yano A, von Schalburg K, Cooper G, Koop BF, Yoshizaki G. Identification of a molecular marker for type A spermatogonia by microarray analysis using gonadal cells from *pvasa*-GFP transgenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev* 2009; 76:246-254.
  16. Nagasawa K, Shikina S, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Lymphocyte antigen 75 (Ly75/CD205) is a surface marker on mitotic germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod* 2010; 83:597-606.
  17. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2004; 36:647-652.
  18. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 2004; 36:653-659.
  19. Bosseboeuf A, Gautier A, Auvray P, Mazan S, Sourdain P. Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *Reproduction* 2013.
  20. Hermann BP, Sukhwani M, Lin C-C, Sheng Y, Tomko J, Rodriguez M, Shuttleworth JJ, McFarland D, Hobbs RM, Pandolfi PP, Schatten GP, Orwig KE. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells* 2007; 25:2330-2338.
  21. Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, Denard BS, Garbers DL, Porteus MH. Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires OCT4, a Factor Downregulated During Retinoic Acid-Induced Differentiation. *Stem Cells* 2008; 26:2928-2937.
  22. Mahla RS, Reddy N, Goel S. Spermatogonial stem cells (SSCs) in buffalo (*Bubalus bubalis*) testis. *Plos One* 2012; 7.
  23. Vansandt LM, Pukazhenthii BS, Keefer CL. Molecular markers of spermatogonial stem cells in the domestic cat. *Reprod Domest Anim* 2012; 47 Suppl 6:256-260.
  24. Froschauer A, Khatun MM, Sprott D, Franz A, Rieger C, Pfennig F, Gutzeit HO. oct4-EGFP reporter gene expression marks the stem cells in embryonic development and in adult gonads of transgenic medaka. *Mol Reprod Dev* 2013; 80:48-58.
  25. Hülkamp M, Schröder C, Pfeifle C, Jäckle H, Tautz D. Posterior segmentation of the *Drosophila* embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene. *Nature* 1989;

<b>Gene name</b>	<b>Agenae clone for ISH</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<i>pou2a</i>	tcbi002.c.01	AAGAGAAACTTTTCGGGATTGATT	GAACGGCCTGTCCTGAACACTT
<i>pou2b</i>		CTCGCACATAGGCAACAAACTG	CCTTGGTTTGATCGCCTTCGTAA
<i>plzfa</i>	/	CCAAGCAGATGGTGGCCAAATG	GGCATGGATCGCATAACTTCG
<i>plzfb</i>	/	GGTACTGTGAACTGCATTGCTAT	TCAGCAGTTTGTTCACTTACCGG
<i>nanos 2</i>	cloned in this study	CGGTGATTACTGCGGCTTCTG	TCAGAATGGGGCAGATGACTTTG
<i>nanos 3</i>	tcba0021.l.07	GAGAGACTTCAGGCTGTTGTT	GTTCCAAACTGCGTCTAAGC
<i>dazl</i>	tcbk0006.a.12	CCCCTTGAGCATGTTGTGATTG	TGACATCCGTTGCTCTGTTTCTG
<i>piwil2</i>	tcay0026.i.22	CAGGGGGAACATTGGAATTTAGG	GCGGCGTGTAGATTGTTGGACTA
<i>rs15</i>	tcce0005.i.17	CCTGGGGGAGTTCTCTATCACCT	GGGATGAAACGGGAAGAATGTGT
<i>pmlc2GFP</i>	/	GACGTAACGGCCACAAGTTCAG	CAGATCAGCTTCAGGGTCAGCTT

**Supplemental table: Primers used in PCR**

- 
- 338:629-632.
26. Kobayashi S, Yamada M, Asaoka M, Kitamura T. Essential role of the posterior morphogen *nanos* for germline development in *Drosophila*. *Nature* 1996; 380:708-711.
  27. Bhat KM. The posterior determinant gene *nanos* is required for the maintenance of the adult germline stem cells during *Drosophila* oogenesis. *Genetics* 1999; 151:1479-1492.
  28. Aoki Y, Nakamura S, Ishikawa Y, Tanaka M. Expression and syntenic analyses of four *nanos* genes in medaka. *Zool Sci* 2009; 26:112-118.
  29. Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved role of *nanos* proteins in germ cell development. *Science* 2003; 301:1239-1241.
  30. Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y. The RNA-Binding Protein NANOS2 Is Required to Maintain Murine Spermatogonial Stem Cells. *Science* 2009; 325:1394-1398.
  31. Suzuki H, Sada A, Yoshida S, Saga Y. The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins *Nanos2* and *Nanos3*. *Dev Biol* 2009; 336:222-231.
  32. Beer RL, Draper BW. *nanos3* maintains germline stem cells and expression of the conserved germline stem cell gene *nanos2* in the zebrafish ovary. *Dev Biol* 2013; 374:308-318.
  33. Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Higashijima Si, Tanaka M. Identification of Germline Stem Cells in the Ovary of the Teleost Medaka. *Science* 2010; 328:1561-1563.
  34. Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Dev* 1986; 26:877-920.
  35. Mazurais D, Montfort J, Delalande C, Le Gac F. Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays. *Gen Comp Endo* 2005; 142:143-154.
  36. Loir M, Sourdain P. CHAPTER 22 - Testes cells: isolation and culture. In: Mommsen PWHaTP, (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Analytical Techniques*. vol. 3: Elsevier; 1994:249-272.
  37. Rolland AD, Lareyre J-J, Goupil A-S, Montfort J, Ricordel M-J, Esquerré D, Hugot K, Houlgatte R, Chalmel F, Le Gac F. Expression profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis. *BMC Genomics* 2009; 10.
  38. Sambroni E, Rolland AD, Lareyre J-J, Le Gac F. Fsh and Lh have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. *J Mol Endocrinol* 2013; 50:1-18.
  39. Loir M. Spermatogonia of rainbow trout: I. Morphological characterization, mitotic activity, and survival in primary cultures of testicular cells. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:422-



- 
- 433.
40. Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail PY, Breton B, Le Gac F. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endo* 1999; 113:413-428.
  41. Billard R. A quantitative analysis of spermatogenesis in the trout, *Salmo trutta fario*. *Cell Tissue Res* 1983; 230:495-502.
  42. Gomez JM, Loir M, Le Gac F. Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenetic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 1998; 58:483-491.
  43. Vizziano D, Randuineau G, Baron D, Cauty C, Guiguen Y. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Dynam* 2007; 236:2198-2206.
  44. Gabillard JC, Rallièrè C, Sabin N, Rescan PY. The production of fluorescent transgenic trout to study in vitro myogenic cell differentiation. *BMC Biotechnol* 2010; 10:39.
  45. Loir M, Sourdain P, Mendis-Handagama SM, Jégou B. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc Res Techniq* 1995; 32:533-552.
  46. Lin Y, Gill ME, Koubova J, Page DC. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* 2008; 322:1685-1687.
  47. Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction* 2003; 126:669-680.
  48. Bruslé S, Bruslé J. An ultrastructural study of early germ cells in *Mugil (Liza) auratus* Risso, 1810 (Teleostei : *Mugilidae*). *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* 1978; 18:1141-1153.
  49. Chiarini-Garcia H, Russell LD. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction* 2002; 123:567-577.
  50. Leal MC, Cardoso ER, Nobrega RH, Batlouni SR, Bogerd J, Franca LR, Schulz RW. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. *Biol Reprod* 2009; 81:177-187.
  51. Gao M, Arkov AL. Next generation organelles: structure and role of germ granules in the germline. *Mol Reprod Dev* 2013; 80:610-623.
  52. Nikolova G, Strilic B, Lammert E. The vascular niche and its basement membrane. *Trends Cell Biol* 2007; 17:19-25.
  53. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y-I. A vasculature-associated niche for undifferentiated



- 
- spermatogonia in the mouse testis. *Science* 2007; 317:1722-1726.
54. Loppion G, Crespel A, Martinez A-S, Auvray P, Sourdain P. Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus canicula* L. *Cell Tissue Res* 2008; 332:533-542.
  55. Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Lin H. MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. *J Biol Chem* 2009; 284:6507-6519.
  56. Ozaki Y, Saito K, Shinya M, Kawasaki T, Sakai N. Evaluation of Sycp3, Plzf and Cyclin B3 expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 2011; 11:309-315.
  57. Suliman BA, Xu D, Williams BRG. The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology. *Front Oncol* 2012; 2.
  58. Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, Obinata M, Abe K, Schöler HR, Matsui Y. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ* 1999; 41:675-684.
  59. Sánchez-Sánchez AV, Camp E, García-España A, Leal-Tassias A, Mullor JL. Medaka Oct4 is expressed during early embryo development, and in primordial germ cells and adult gonads. *Dev Dynam* 2010; 239:672-679.
  60. Extavour CG, Pang K, Matus DQ, Martindale MQ. vasa and nanos expression patterns in a sea anemone and the evolution of bilaterian germ cell specification mechanisms *Evol Dev* 2005; 7:201-215.
  61. Subramaniam K, Seydoux G. nos-1 and nos-2, two genes related to *Drosophila* nanos, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 1999; 126:4861-4871.
  62. Haraguchi S, Tsuda M, Kitajima S, Sasaoka Y, Nomura-Kitabayashi A, Kurokawa K, Saga Y. nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech Dev* 2003; 120:721-731.
  63. Suzuki A, Igarashi K, Aisaki K-i, Kanno J, Saga Y. NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:3594-3599.
  64. Santos Nassif Lacerda SM, Costa GMJ, da Silva MdA, Almeida Campos-Junior PH, Segatelli TM, Peixoto MT, Resende RR, de França LR. Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen Comp Endo* 2013; 192:95-106.



- 
65. Ohmura M, Yoshida S, Ide Y, Nagamatsu G, Suda T, Ohbo K. Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-4/EGFP transgenic mice. *Arch Histol Cytol* 2004; 67:285-296.
  66. Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y. Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science* 2003; 301:1239-1241.
  67. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Gene Dev* 2000; 14:841-853.
  68. Reijo RA, Dorfman DM, Slee R, Renshaw AA, Loughlin KR, Cooke H, Page DC. DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol Reprod* 2000; 63:1490-1496.



---

## II - Résultats complémentaires

### *A. Des descendants positifs issus d'individus transplantés en deuxième cycle de spermatogenèse*

Outre l'identification des spermatogonies souches par des caractéristiques morphologiques et moléculaires, nous avons pu confirmer la présence de ces dernières grâce à leurs caractéristiques fonctionnelles qui leur sont propres. En effet, les cellules souches sont les seules cellules de l'organisme capable de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules spécialisées. Une autre de leurs propriétés, la colonisation de la niche, a aussi été démontrée pour deux types de cellules souches au moins, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches germinales (Brinster and Zimmermann, 1994 ; Stewart et al. 1993). En effet, ces cellules sont capables de répondre à des signaux émis par la niche pour migrer au sein de l'organisme et la rejoindre. Ces propriétés singulières des cellules spermatogoniales souches peuvent être analysées expérimentalement par diverses techniques telles que la clonogénicité, le pulse-chase au BrdU ou encore la transplantation. Cette dernière technique permet à la fois d'analyser la colonisation de la niche, la prolifération et la différenciation de la population de cellules souches. Elle est couramment utilisée chez les rongeurs et permet d'évaluer l'enrichissement relatif d'une population cellulaire en SSCs en analysant notamment le nombre de colonies formées à l'issue de la transplantation. Cette technique a aussi rapidement été adaptée au modèle poisson. Notamment, l'équipe de Yoshizaki utilisant la truite arc-en-ciel comme modèle d'étude principal, a développé une technique de transplantation de cellules germinales (CGPs ou SSCs) dans la cavité péritonéale d'un embryon au moment de la migration endogène des CGPs du receveur (Takeuchi et al., 2003).

Plusieurs prérequis sont nécessaires pour pouvoir utiliser la technique de transplantation. Les cellules transplantées (et leurs descendances éventuellement) doivent pouvoir être identifiables au sein du testicule de l'individu receveur. Pour cela, les cellules peuvent être marquées avant l'injection (BrdU, PKH26, ...), être marquées intrinsèquement (lignées transgéniques exprimant la GFP par exemple dans les cellules germinales) ou avoir un génotype distinct du receveur (lignée transgénique, transplantation xénogénique) (Lacerda et al., 2013). Deuxièmement, le receveur ne doit pas rejeter les cellules transplantées. Chez les mammifères, l'utilisation de Nude mice permet donc d'éliminer cette difficulté (Rodriguez-Sosa et al., 2013), ces souris étant immunodéficientes. Chez les poissons, le système immunitaire se met en place



---

tardivement et il n'y a pas de barrière hémato-testiculaire permettant donc la transplantation de cellules exogènes chez l'embryon ainsi que chez l'adulte directement via la papille uro-génitale (Li and Leatherland et al., 2012). Enfin, la troisième condition, qui n'apparaît tout de même pas absolument nécessaire mais qui augmente l'efficacité de l'expérience, est l'élimination de la spermatogenèse endogène du receveur. Chez les mammifères, les traitements ionisants ou chimiques (busulfan) permettent d'éliminer les cellules germinales du receveur même si des spermatogonies souches subsistent, comme montré par la reprise de la spermatogenèse et la production de spermatozoïdes quelques mois après le traitement (Zohni et al., 2012). Le busulfan est aussi utilisé chez certaines espèces de poissons (Nobrega et al., 2010 ; Lacerda et al., 2010). Enfin, il a été montré que l'inactivation du gène *deadend* par injection de morpholinos chez l'embryon en développement induit des défauts de colonisation des CGPs tandis que le reste de la gonade est normalement formé (Weidinger et al., 2003). Les individus ainsi produits constituent une population d'individus de choix pour la transplantation de cellules souches spermatogoniales.

Au cours de ma thèse, nous nous sommes appuyés sur les travaux de l'équipe de Yoshizaki et nous les avons adaptés à nos besoins. Nous avons donc testé la présence de cellules spermatogoniales souches en transplantant une population de cellules germinales dans la cavité péritonéale d'embryons péri-éclosion. Une partie de nos résultats sont présentés dans l'article 1. Dans la partie ci-après, le protocole d'isolement de spermatogonies, de transplantation et d'estimation du taux de succès est décrit précisément. Des résultats complémentaires obtenus par la technique de transplantation vont être ensuite présentés.

### **Protocole expérimental :**

#### **- Lignée transgénique**

Afin d'évaluer l'efficacité de la transplantation, il est nécessaire d'utiliser une population cellulaire qui peut être reconnue au sein de la lignée germinale de l'embryon receveur. Ne possédant pas de lignée exprimant intrinsèquement un marquage fluorescent des cellules germinales, nous avons utilisé une méthode indirecte en utilisant une lignée transgénique exprimant la GFP dans d'autres types cellulaires. La lignée *mlc2::GFP* exprime la GFP sous le contrôle du promoteur *myosin light chain 2*. L'expression de la GFP est donc spécifique aux cellules musculaires (Gabillard et al., 2010).



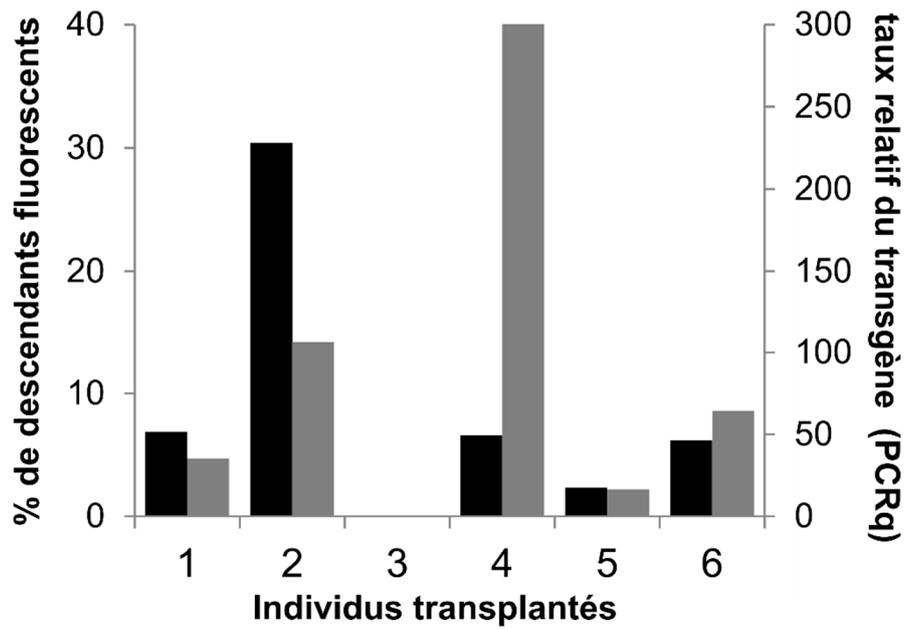
---

- Isolement des spermatogonies

Après avoir anesthésié les poissons dans du 2-phénoxyéthanol (0.01%), ils sont abattus d'un coup sur la tête. L'animal est pesé, puis les testicules sont récoltés et pesés à leur tour. Ces deux données nous permettent d'estimer le RGS (Rapport Gonado-Somatique) et caractérisent l'état d'avancement de la spermatogenèse. Le RGS est strictement inférieur à 0.05% pour l'individu immature (notre modèle d'intérêt pour cette expérience). Les gonades prélevées sont transportées dans du milieu L15 additionné d'antibiotiques. Elles vont être coupées en très petits morceaux (0.5 mm) au « tissue chopper », puis mises dans un milieu de dissociation L15 additionné de collagénase (10 mg/ml). Après 6h de dissociation à 12°C sous agitation, le milieu de dissociation est remplacé par du L15 + BSA 1% pour inactiver l'activité collagénase résiduelle. Après une nuit, les cellules vont pouvoir être isolées grâce à une dissociation mécanique au « potter », avec élimination progressive des fibres et des morceaux non dissociés par filtration sur membrane en nylon (150, 50, et 32 µm). La fraction cellulaire contient alors des spermatogonies, des cellules somatiques, des cellules mortes et de nombreuses hématies. La population de cellules sanguines est grandement éliminée par utilisation de Percoll. Les cellules (fraction testiculaire totale) sont ensuite soumises à l'élutriation centrifuge. Grâce à une vitesse de centrifugation constante couplée à un flux de liquide continu avec une vitesse croissante, les cellules vont pouvoir être triées selon leur taille et leur masse. Ainsi les spermatogonies A (les plus grosses cellules germinales) vont être isolées des autres types germinaux et des cellules somatiques qui s'agrègeront entre elles et seront récoltées dans la fraction « arrêt ».

- Transplantation

Les spermatogonies A ainsi enrichies vont être comptées et concentrées à hauteur 5 millions de cellules dans 20µl. Les embryons receveurs monosexes mâle (issu d'une fécondation avec du sperme YY) d'environ 300° jour (27-30dpf) vont être premièrement déchorionnés puis anesthésiés légèrement dans une solution de 2-phénoxyéthanol (0.003%). Les cellules (dans du milieu L15) sont prélevées dans une coupelle grâce à l'extrémité du microcapillaire et injectées (environ 10 000 cellules) dans la cavité péritonéale de l'embryon positionné sur le côté. Après avoir vérifié la bonne injection des cellules dans la cavité (léger gonflement au lieu de l'injection), les individus sont placés dans une solution isotonique pour une nuit à 12°C. Les embryons sont ensuite transférés dans la structure d'alevinage et subissent les conditions normales d'élevage.



**Figure 27 : Comparaison entre le pourcentage de descendants transgéniques et le taux de transgènes détectés dans le sperme d'un même individu.**

En noir est représenté le pourcentage de descendants transgéniques, en gris le taux relatif de transgènes détectés en PCR quantitative dans le sperme.

---

- Test de l'efficacité de transplantation

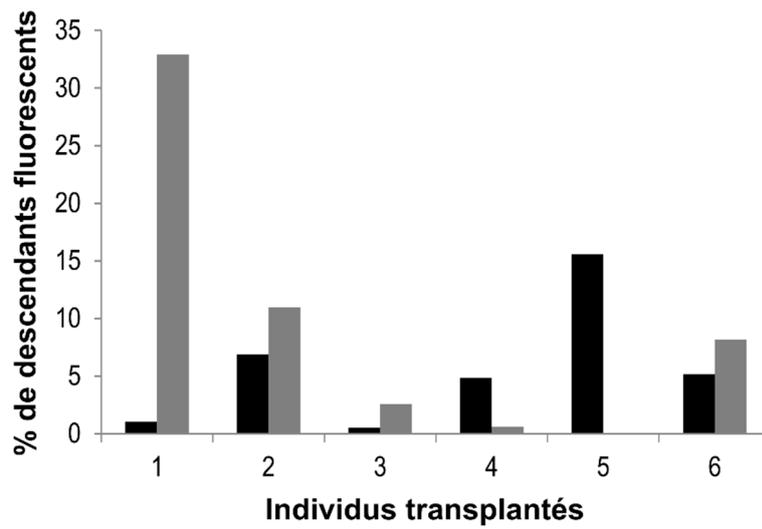
Dans un premier temps, nous avons voulu observer la colonisation de la gonade par les cellules souches spermatogoniales (SSCs) à court terme après la transplantation. Pour cela, les cellules furent marquées avant injection avec un colorant fluorescent des membranes, le PKH26. Au vu de nos observations peu concluantes et de la difficulté de manipulation des embryons, cette technique a été abandonnée au profit de l'utilisation d'individus transgéniques. L'utilisation de cellules issues de la lignée transgénique *mlc2::GFP* permet d'évaluer la colonisation et la survie des cellules souches transplantées au sein du testicule par génotypage, ainsi que la différenciation de ces cellules en gamètes matures fonctionnels par transmission du génotype à la descendance. En revanche, l'utilisation de cette lignée ne permet pas de suivre directement la fluorescence dans les testicules puisque les cellules germinales issues de ces animaux n'expriment pas la GFP.

À moyen terme (5-6 mois), les gonades des animaux transplantés furent récoltées et leur ADN génomique extrait. Pour ce faire les gonades sont incubées une nuit à 42°C en présence de protéinase K pour lyser les cellules et de chelex pour ségréger les déchets organiques. L'ADN est ensuite extrait grâce à du Phenol/Chloroforme. La présence du génotype des cellules injectées est ensuite mesurée par PCR et/ou PCRq en utilisant un couple de primers spécifiques de la séquence de la GFP.

À plus long terme (1 à 2 ans), la présence de descendants possédant le génotype est évaluée. Une partie des animaux transplantés est mature, et ces derniers produisent du sperme un an après la transplantation. Le sperme est alors récolté et utilisé pour faire une FIV avec des œufs issus de femelles sauvages. Plus précisément, deux réplicats de 200 œufs sont fécondés avec une quantité en excès de sperme (par rapport aux recommandations d'élevage). En parallèle, un échantillon de sperme est prélevé pour le test de génotypage. 35 jours plus tard, les embryons ont éclos, permettant ainsi d'observer directement au microscope sous UV l'expression de la GFP dans les muscles squelettiques. Les individus positifs sont comptés, traduisant la présence de cellules spermatogoniales souches transplantées initialement.

### **Résultats et discussion :**

Plusieurs résultats issus des expériences de transplantation sont présentés dans l'article 1. Cependant quelques données intéressantes n'ont pas pu être incluses. Par PCR et par le test de fécondation, nous avons montré des taux très variés de présence du transgène et du nombre de



**Figure 28 : Comparaison entre le % de descendants transgéniques entre le premier et le deuxième cycle de spermatogenèse.**

En noir est représenté le % de descendants transgéniques en année 1, en gris le % de descendants transgéniques en année 2.

---

descendants positifs, au sein d'individus transplantés avec la même population cellulaire initiale (article 1). En analysant en parallèle le taux de descendants positifs et le taux de transgène détecté par PCRq dans le sperme pour un même individu, les taux détectés ne semblent pas se corrélérer (figure 27). En effet, pour certains individus, on détecte un taux relatif élevé du transgène tandis que peu de descendants fluorescents ont été comptés (individu 4). Inversement, un individu qui a donné beaucoup de descendants fluorescents n'a pas un taux de détection du transgène très élevé (individu 2). Enfin, il est intéressant de noter que les résultats positifs de détection du transgène par PCRq sont bien le reflet de la détection positive d'au moins un descendant transgénique.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. La variation du nombre de descendants ou du taux en PCR de transgènes entre individus d'une même population peut-être dû à des variations techniques du nombre de cellules transplantées, donc du nombre de spermatogonies souches. En revanche, les variations pour un même individu du taux de détection du transgène par PCRq et du taux de descendants, laissent supposer qu'une part de la variation est due aussi à nos méthodes de détection. Cette non corrélation est probablement due à l'utilisation d'un échantillon de sperme qui ne reflète probablement pas efficacement la production de spermatozoïdes issus des spermatogonies souches transplantées. Enfin, ces résultats confirment tout de même que nos méthodes de détection permettent une évaluation relative de l'efficacité de transplantation puisque pour chaque individu les résultats des deux méthodes sont cohérent pour la détection positive/négative du succès de transplantation. Certains animaux transplantés ont été conservée après avoir effectué leur premier cycle de spermatogenèse. La présence de descendants transgéniques issus de ces animaux a été testée à nouveau à l'issue de leur second cycle de spermatogenèse.

L'information la plus importante issue du test de fécondation à l'issue du deuxième cycle de spermatogenèse est la présence de descendants transgéniques (figure 28). Au cours du deuxième cycle et à partir des cellules transplantées, il y a production de spermatozoïdes matures transgéniques. Nous pouvons donc en conclure qu'au moins parmi la population de spermatogonies transplantées se trouvaient des vrais spermatogonies souches. En effet, les progéniteurs sont déjà engagés dans la voie de différenciation et ont un faible pouvoir d'auto-renouvellement. Il est intéressant de noter que la production individuelle de descendants varie en fonction des cycles spermatogénétiques avec une augmentation ou une diminution de la production. Là encore cela reflète les limites de nos méthodes de détection et la variabilité intra-individuelle de production de spermatozoïdes matures issus des cellules transplantées.



---

## B. La famille *nanos*, une histoire évolutive complexe

### Introduction

Au vu de nos résultats très encourageants pour la conservation de *nanos2* comme marqueur des spermatogonies souches entre vertébrés très éloignés phylogénétiquement (article 1), nous avons souhaité procéder à une analyse plus détaillée de l'évolution de ce gène. D'autres données accumulées dans la littérature supportent l'intérêt d'une telle étude qui s'étend aux autres membres de cette famille. *nanos* est un marqueur des spermatogonies souches chez la drosophile (Forbes and Lehman, 1998 ; Kobayashi et al., 1996). Chez le médaka, *nanos2* identifie les ovogonies souches (Nakamura et al., 2010). Enfin, *nanos3*, un autre membre de la famille *nanos* est aussi exprimé dans les cellules germinales souches, notamment son expression est indispensable dans les CGPs chez les mammifères et chez le poisson-zèbre (Beer and Draper, 2013 ; Suzuki et al., 2007).

Plusieurs études phylogénétiques ont été menées pour rendre en compte des relations d'orthologies des gènes *nanos* identifiés chez les poissons téléostéens (Aoki et al., 2009; Beer and Draper, 2013). Pourtant, les arbres phylogénétiques proposés ont des faibles scores de confiance. De plus, l'étude de la synténie (conservation de l'environnement génique) de *nanos2* en particulier n'a permis aucune conclusion claire quant à son origine évolutive. Des travaux préliminaires sur l'histoire évolutive de la famille *nanos* ont été menés au cours de ma thèse afin d'affiner les incertitudes soulevés par ces études notamment sur les relations d'orthologies entre des gènes *nanos2* chez les poissons téléostéens et ceux identifiés chez les autres vertébrés.

### Méthodes

- Identification des gènes *nanos*

Les protéines Nanos sont caractérisées par deux domaines en doigt de zinc au niveau de la queue C-terminale. La séquence protéique de ces domaines est extrêmement bien conservée entre le NANOS à copie unique décrit chez la drosophile et les trois gènes *nanos* identifiés chez la souris. De ce fait, nous avons procédé à un crible exhaustif des gènes *nanos* présents dans des génomes d'intérêt évolutif par « tblastn » avec le domaine C-terminal de la protéine. Nous avons inclus dans notre analyse, des espèces ancestrales de l'arborescence des vertébrés dont les génomes ont été récemment séquencés ou sont en cours d'assemblage. Les génomes étudiés



---

comportent la lamproie (*Petromyzon marinus*) une des espèces de vertébrés les plus anciennes dans l'embranchement des métazoaires et qui n'a *a priori* pas subi les deux premiers évènements de duplications successives du génome (1R/2R) (Cloutier, 2010). La chimère (elephant shark - *Callorhynchus mili*) est un chondrichthyen qui a émergé avant la divergence entre les sarcoptérygiens (auxquels les mammifères appartiennent) et actinoptérygiens (auxquelles les téléostéens appartiennent) (Venkatesh et al., 2014). Parmi les sarcoptérygiens, le cœlacanthe (*Latimeria chalumnae*) ainsi que l'homme (*Homo sapiens*) ont été étudiés. Le premier pour l'aspect ancestral de son génome, l'autre comme représentant des mammifères. Au sein des actinoptérygiens, le gar (*Lepisosteus oculatus*) a été aussi sélectionné. Ce n'est pas un poisson téléostéen, il n'a donc pas subi la duplication globale du génome appelée 3R (Ohno, 1968). Au sein des téléostéens, le poisson-zèbre (*Danio rerio*) a été sélectionné puisqu'il possède l'un des génomes téléostéens les mieux annotés. Un autre téléostéen modèle, le tilapia (*Oreochromis niloticus*) a également été choisi. Enfin, nous avons mené une recherche sur le génome de truite (en cours de publication – projet GENOTROUT). Les salmonidés, dont fait partie la truite, ont subi à nouveau une duplication globale du génome (4R) (Allendorf and Utter, 1976). Les duplications globales des génomes qui se sont succédées au cours de l'évolution des poissons font qu'un gène chez les mammalien peut avoir quatre gènes onhologues (gènes orthologues générés par duplication globale du génome) chez la truite.

Pour certaines espèces, les protéines complètes codées par les gènes nanos sont disponibles à partir de certains génomes séquencés. Pour d'autres, il a été nécessaire de procéder à la reconstruction de la protéine complète en identifiant les séquences codantes sur les génomes ou en interrogeant les bases de données d'ESTs par tblastn. L'identification des gènes fut facilitée du fait de la petite taille des protéines Nanos (100 à 300 acides aminés) et du découpage en un ou deux exons rapprochés de la séquence codante sur les génomes.

#### - Reconstruction phylogénétique

Après avoir aligné l'ensemble des séquences protéiques par ClustalW, nous avons éliminé les parties N et C-terminale trop divergentes et garder des tailles constantes. Certaines protéines n'ont pour le moment pas pu être reconstruites dans leur intégralité et ont donc dû être éliminées pour ne pas altérer la robustesse de la reconstruction phylogénétique.

L'arbre phylogénétique a été reconstruit grâce au logiciel Mega5. Un exemple d'arbre phylogénétique obtenu avec la matrice Maximum likelihood et le modèle Jones-Taylor-Thornton (JTT) est présentée figure 30. Un ensemble de 1000 répliquions a été effectué pour



---

le calcul de la robustesse des embranchements par bootstrap. Pour la construction de l'arbre phylogénétique, la protéine Nanos de la drosophile a été utilisée comme groupe externe pour enraciner l'arbre car elle est la seule représentante de cette famille chez cette espèce la plus ancienne de notre panel. Plusieurs méthodes de reconstruction phylogénétique ont également été conduites (Maximum likelihood, Neighbor joining, Parcimonie).

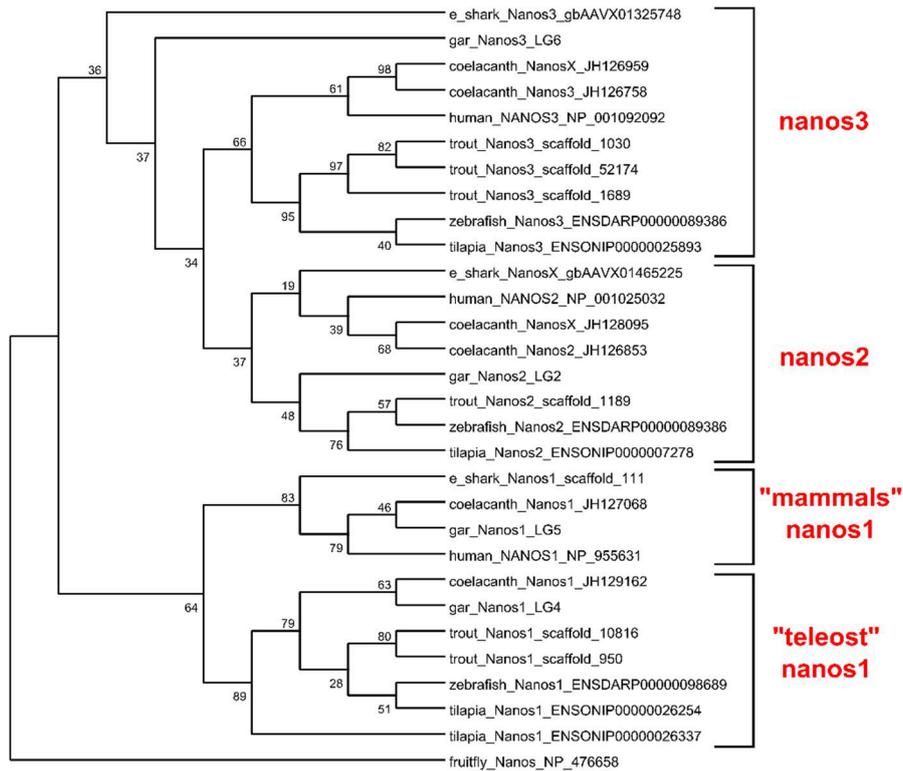
- Analyse des synténies

La synténie est la conservation du regroupement de gènes sur des fragments chromosomiques chez plusieurs espèces parfois phylogénétiquement très éloignées. Malgré des remaniements chromosomiques constants, l'environnement génique d'un gène dans plusieurs génomes peut permettre de préciser les relations d'orthologies en suivant l'évolution de l'environnement de chacune des copies dupliquées. Grâce aux données Ensembl et à l'outil Genomicus (Muffato et al., 2010), nous avons comparé l'environnement génique de chacun des gènes nanos dans tous les génomes étudiés à l'exception de la truite. A nouveau, des gènes ont dû être éliminés de l'analyse car leur localisation dans le génome n'avait pas encore été identifiée par les outils bioinformatiques disponibles.

## Résultats

### *Des duplications multiples des gènes codant pour les protéines Nanos chez les vertébrés*

De nombreux gènes codant pour des protéines apparentées à la protéine NANOS de la drosophile sont retrouvés dans les génomes de vertébrés (Figure 29). Trois gènes *nanos* sont décrits chez les mammifères et cela a été confirmé par nos recherches par blast. De manière inattendue, nos observations montrent de multiples duplications supplémentaires des membres de la famille Nanos chez les vertébrés qui ont émergés plus précocément. Ainsi, 8 gènes codant pour des protéines comportant le domaine en doigts de zinc caractéristique des protéines Nanos ont été identifiés dans le génome du coelacanthe dont deux ont un codon STOP au sein du cadre de lecture de la protéine prédite. De même, cinq gènes *nanos* sont observés dans le génome de la chimère dont un possède une mutation sur une des cystéines. L'histoire se complexifie avec l'identification de trois *nanos* chez la lamproie. Trois à quatre *nanos* sont détectées chez les actynoptériens non téléostéens. Chez la truite, nous avons identifiés au total sept gènes *nanos*. Parmi ces sept gènes, quatre possèdent des motifs qui caractérisent les *nanos3*, un gène est apparenté à *nanos2*, et deux gènes correspondent à *nanos1*.



**Figure 30 : Arbre phylogénétique retraçant l'évolution des gènes nanos au sein des métazoaires.**

L'arbre phylogénétique a été reconstruit grâce au logiciel Mega5. La matrice utilisée fut Maximum likelihood avec le modèle Jones-Taylor-Thornton (JTT) avec 1000 répliques pour le calcul de la robustesse des embranchements par bootstrap.

---

### ***L'analyse des relations d'orthologies entre les différentes protéines Nanos de vertébrés montrent une histoire évolutive complexe***

Nous avons approfondi l'analyse des membres de la famille des protéines Nanos en définissant les relations d'orthologie entre les différentes protéines Nanos codées par les génomes de Gnathostomes. Pour cette étude, nous avons conduit des approches complémentaires de phylogénie (figure 30) et d'étude de fragments chromosomiques définissant une synténie (figure 31). Quelque soit les algorithmes utilisés pour la reconstruction phylogénétique, les arbres obtenus montrent des embranchements qui ne sont pas toujours cohérent avec l'arbre de la vie ce qui suggère une histoire évolutive complexe. Nous avons également réalisé une étude de synténies pour conforter les hypothèses de cette histoire évolutive. L'éléphant shark qui est l'espèce la plus ancestrale du panel de vertébrés considérés pour cette étude possède déjà trois gènes codant pour des protéines Nanos. Deux de ces protéines (Nanos1 et Nanos2) ségrègent clairement avec les protéines mammaliennes Nanos 1 et 2 respectivement. La troisième protéine est apparentée aux protéines Nanos3 bien que le positionnement de son embranchement ne soit pas totalement cohérent avec l'arbre de la vie. Quoiqu'il en soit, l'émergence des 3 sous familles de protéines Nanos est antérieure apparaît antérieure à l'émergence des poissons Chondrichtiens. De plus, l'arbre phylogénétique suggère que les protéines Nanos2 et Nanos3 sont issues de la duplication d'un gène ancestral commun puis chaque sous-famille a suivi une évolution indépendante.

#### ***Evolution des gènes codant pour les protéines apparentées à Nanos1***

Le gène *nanos1* a été généré par une première duplication chez les espèces les plus ancestrales des vertébrés avant la divergence des Sarcoptérygiens et des Actinoptérygiens comme le montre la présence de deux protéines Nanos1 chez la chimère, le coelacanthe et le gar. Il apparaît aussi clairement que l'une des deux copies a été perdue chez les poissons téléostéens et chez les mammifères mais ces deux taxons n'ont pas retenu la même copie. De plus, un gène Nanos1 supplémentaire a émergé chez certains poissons téléostéens du groupe des percomorphes. L'analyse des fragments chromosomiques synténiques conforte sans ambiguïté ces deux observations (figure 31). En conséquence, les gènes Nanos1 des poissons téléostéens et des mammifères ne sont pas des orthologues mais des paralogues ce qui n'empêche pas qu'ils pourraient exercer des fonctions identiques ou similaires.

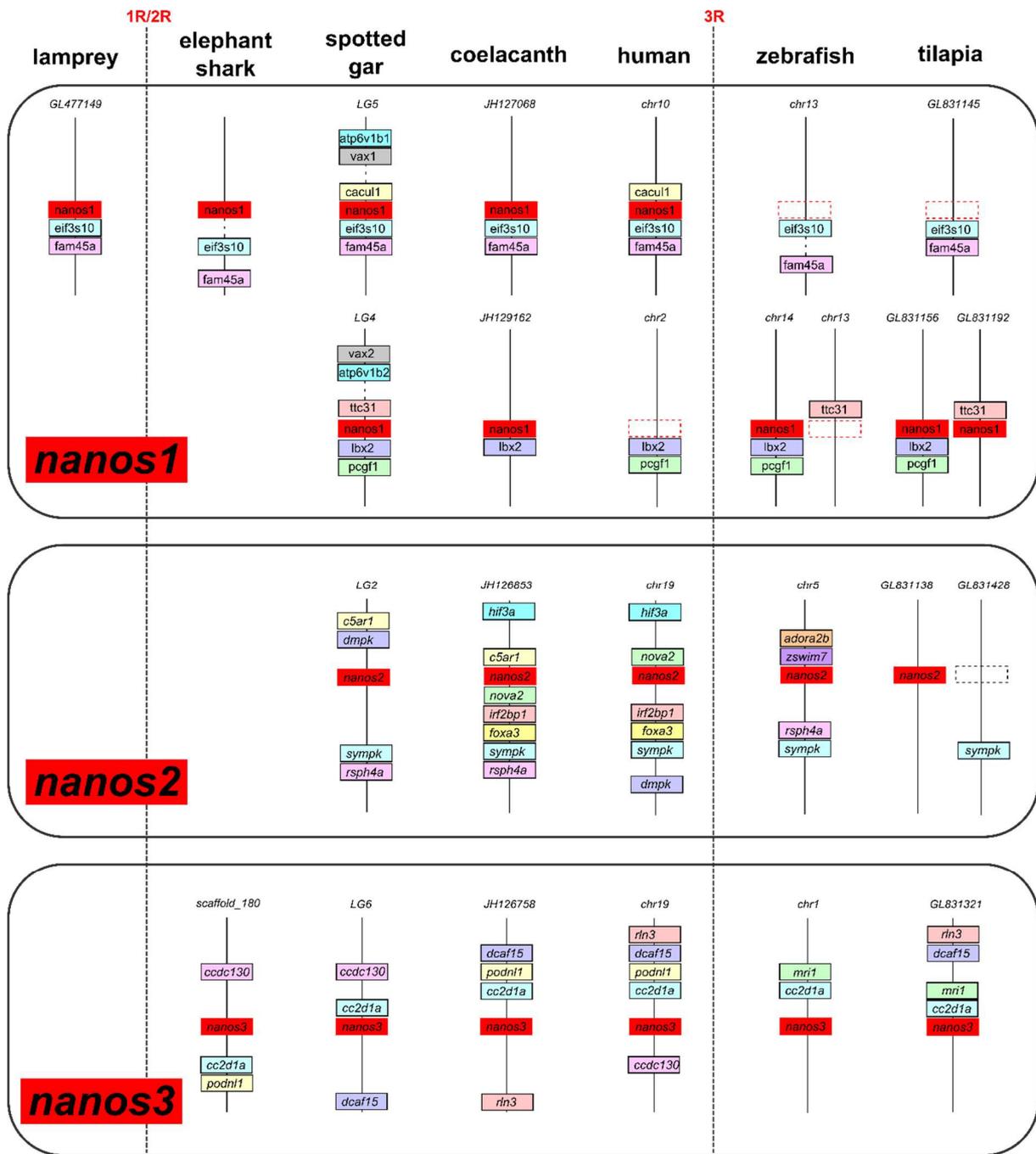


Figure 31 : Synténie des gènes nanos

---

### ***Evolution des gènes codant pour des protéines apparentées à Nanos2***

Le gène *nanos2* est retrouvé en copie unique chez les Gnathostomes. De manière intéressante, le gène *nanos2* de l'éléphant shark ségrège avec les *nanos2* humain et du coelacanthe mais il ne se place pas à la base de l'embranchement entre les *nanos2* de sarcoptérygiens et des téléostéens. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette situation. Il se pourrait qu'il existe encore un autre *nanos2* dans le génome de l'éléphant shark qui serait plus homologues à celui des poissons des téléostéens. Cependant, le placement des gènes *nanos2* issus des poissons téléostéens pourraient indiquer une évolution rapide de ce gène chez ces espèces. L'analyse de la synténie est en faveur de cette dernière hypothèse. En effet, la synténie entourant le gène *nanos2* est très faiblement conservé chez les vertébrés. Pourtant, nous observons la présence d'au moins un gène (*sympk*) présent à proximité du gène *nanos2* chez l'homme, le coelacanthe, le gar et le zebrafish. Cette observation conforte l'hypothèse que les protéines Nanos2 mammaliennes et téléostéennes sont bien orthologues. Cette conclusion doit être modérée car nous observons que la synténie n'est pas conservée avec d'autres poissons percomorphes comme le tilapia. Ces données suggèrent qu'il y a eu de forts remaniements chromosomiques dans la zone de synténie de *nanos2* chez ces poissons téléostéens.

### ***Evolution du gène nanos3***

Nous pouvons observer que les protéines de la sous famille Nanos3 prédites chez les espèces ancestrales comme l'éléphant shark et le gar sont assez divergentes des protéines mammaliennes et téléostéennes ce qui est probablement la cause des embranchements qui ne sont pas cohérent avec l'arbre de la vie. Cependant, on peut observer que les protéines prédites des poissons téléostéens ségrègent avec les protéines issues des sarcoptérygiens. Ceci suggère que ces protéines dérivent d'un gène ancestral commun. Cette hypothèse est également confortée par la conservation de la synténie. Cependant, contrairement aux autres poissons téléostéens retenus pour cette étude, on peut noter que la truite possède au moins 4 gènes codant pour des protéines de type Nanos3. Il est probable que ces derniers sont issus des duplications globales 3R et 4R. En attendant la possibilité de faire une étude plus détaillée de chacun des locus lorsque le génome de truite sera assemblé et annoté, on ne peut pas encore exclure une duplication *in situ* de ce gène chez la truite.

### **Discussion**

Notre étude phylogénétique montre l'existence des trois gènes *nanos* chez l'éléphant shark ce qui implique que la diversification des membres de la famille *nanos* est antérieure à celle des



---

Gnathostomes. Les protéines Nanos2 et Nanos3 sont phylogénétiquement plus proches entre elles qu'avec Nanos1. Les gènes *nanos2* et *nanos3* pourraient être apparus à la suite des deux rounds de duplication du génome 1R/2R à partir d'un même gène ancestral, *nanos2/3*. De même, les deux *nanos1* détectés dans le génome du coelacanthe et du spotted gar sont probablement issus de la duplication 1R ou 2R d'un gène ancestral commun. Cependant, les gènes *nanos1* des poissons téléostéens ne sont probablement pas les orthologues des gènes mammaliens mais plutôt des paralogues. Enfin, nous avons bien confirmé l'orthologie entre les *nanos2* identifié chez les sarcoptérygiens et les actynopérygiens dont fait partie la truite.

Pourtant, des données sont manquantes afin de mieux comprendre l'évolution qu'a subie la famille *nanos* chez les vertébrés. Il serait nécessaire d'augmenter le nombre d'espèces utilisés pour ces analyses surtout chez les chondrichthiens et les actinoptérygiens non téléostéens afin de palier au risque de manque d'information sur une espèce donnée. Notre étude n'a pas permis de conclure sur l'origine de tous ces gènes ainsi que de leur perte importante dans les autres génomes. Il serait nécessaire d'approfondir la reconstitution de ces gènes puisque nombreux furent éliminés au cours de notre analyse en raison d'un manque d'information sur la séquence protéique. Enfin, il serait envisageable d'introduire les données du génome de truite dont l'assemblage est en cours et dont la synténie est partiellement analysable sur Genomicus. La synténie a été analysé ici globalement du point de vue de la conservation des gènes proches entourant les *nanos*. L'origine de nouveaux gènes résulte au moins en partie de duplication complète du génome. Les gènes de la synténie ont donc aussi été dupliqués. Une nouvelle approche serait donc de faire une étude synténique en tenant en compte des gènes possédant des paralogues dans la synténie de chacun des *nanos*.

Pour conclure, cette étude nous a permis d'approfondir l'histoire évolutive complexe des gènes *nanos*. Des données chez de nombreuses espèces montrent l'implication des gènes de cette famille dans les cellules germinale souche et dans le plasma germinal des ovocytes d'espèces anamniotes. En particulier, *nanos2* est spécifiquement exprimé dans les spermatogonies indifférenciées les plus précoces chez la souris (As et Apr) (Sada et al., 2009; Suzuki et al., 2007). Chez le medaka, *nanos2* est exprimé spécifiquement par les ovogonies souches. Dans le premier article, nous montrons une expression spécifique de *nanos2* dans une sous-population de spermatogonies indifférenciées (Nakamura et al., 2010). Ces résultats sont donc cohérents avec son histoire évolutive. La conservation de la séquence protéique et du rôle des *nanos* entre des espèces très éloignés phylogénétiquement soutient le rôle fondamental de ce gène dans la biologie des cellules germinales souches.



---

### III – Conclusions du volet 1

Au sein de ce premier volet du projet de thèse, grâce à la combinaison d'études phylogénétiques, d'approches morphologiques et moléculaires, et l'utilisation d'un test fonctionnel, nous avons pu affiner l'identification et la caractérisation de la population de cellules souches spermatogoniales au sein du testicule de truite.

La spermatogenèse fortement saisonnée chez cette espèce nous a permis d'avoir accès à des stades testiculaires d'intérêt pour l'étude des spermatogonies souches. En effet, le testicule d'animal immature ne contient que des spermatogonies A indifférenciées. Avec l'entrée en puberté, les premières spermatogonies B commencent à apparaître, puis à leur tour les autres types de cellules germinales de plus en plus différenciées. En fin de cycle, à la spermiation, il ne reste plus que de nombreux spermatozoïdes et quelques rares spermatogonies A. Ces cellules sont considérées comme les cellules souches, support du prochain cycle spermatogénétique. En lien avec la spermatogenèse, nous avons confirmé l'aspect indifférencié (souche) au niveau morphologique des spermatogonies résiduelles chez le spermiant. Ces spermatogonies expriment des marqueurs de cellules souches identifiés chez les mammaliens, *nanos2* et *nanos3*, *pou2* et *plzf*. De même, aux autres stades de développement spermatogénétique, au moins une fraction des spermatogonies A expriment ces marqueurs spécifiquement.

En particulier, *nanos2* est détecté dans une sous-population de spermatogonies A (<20%) chez l'animal immature et au stade IV, et dans toutes les spermatogonies A du testicule de l'animal spermiant. Grâce à une analyse phylogénétique approfondie, nous avons pu confirmer que *nanos2* et *nanos3* sont probablement issus de la duplication d'un gène ancestral avant la scission entre sarcoptérygiens et actinoptérygiens. De plus, *nanos2* et *nanos3* de truite apparaissent comme les orthologues respectifs de *nanos2* et *nanos3* des mammifères. Ces deux gènes sont détectés dans les populations de spermatogonies A indifférenciées chez la souris (Sada et al., 2009; Suzuki et al., 2007; Tsuda et al., 2003). Plus précisément, *nanos2* est exprimé dans les spermatogonies A indifférenciées les plus précoces, As et Apr. Au vu de nos résultats et des données de la littérature, nous proposons que *nanos2* (au niveau transcriptionnel) identifie la population de spermatogonies souches chez la truite arc-en-ciel.

Dans cette première partie, nous avons aussi testé le caractère souche de populations enrichies en spermatogonies A indifférenciées de truite. Pour ce faire, nous avons adapté une technique de transplantation chez l'embryon et mis au point une méthode pour estimer l'efficacité de la colonisation et de la participation à la spermatogenèse endogène des cellules injectées. En



---

transplantant une population de spermatogonies A indifférenciées enrichies à partir d'un testicule immature, nous observons que ces cellules ont été capables de coloniser, de proliférer et de se différencier au sein du testicule du receveur. Ces résultats confirment la présence de spermatogonies souches au sein de la population de cellules spermatogoniales, population qui exprime les marqueurs de spermatogonies souches (*nanos2* et *nanos3*, *pou2* et *plzf*). De plus, les cellules transplantées ont été capables de participer au deuxième cycle de spermatogenèse, confirmant ainsi qu'une part des cellules n'est pas des progéniteurs mais de vraies spermatogonies souches.

Le deuxième objectif de mon projet de thèse fut d'étudier les voies de régulations contrôlant le devenir des spermatogonies souches. Les résultats obtenus sont présentés dans la partie suivante.



---

# RESULTATS

## Volet 2

Régulation du devenir des cellules spermatogoniales  
souches de truite



---

En s'appuyant sur les données de la littérature, deux voies de signalisation du devenir des spermatogonies apparaissent comme les plus importantes : la voie GDNF/GFRA1 et la voie KIT LIGAND/CKIT ( Allard et al., 1996; Hofmann et al., 2005; Kubota et al., 2004; Meng et al., 2000; (Ohta et al., 2000, 2003). Après avoir identifié les orthologues truite des gènes codant pour ces protéines, nous avons analysé leur profil d'expression au cours du cycle spermatogénétique et dans les fractions de cellules testiculaires isolées. D'autre part, au vu du rôle connu de Fsh comme régulateur de la prolifération des spermatogonies chez les vertébrés (mammifères ainsi que téléostéens) (McLahan et al, 2002; Shetty et al, 1996; Meachem et al, 1999 ; Loir, 1999; Ohta et al., 2007), et de données suggérant un rôle de cette hormone dans le contrôle de l'expression des facteurs GDNF et KIT LIGAND (Tadokoro et al., 2002 ; Orth et al., 2000) nous avons procédé à l'analyse de son effet *in vitro* sur l'expression de ces gènes, en culture d'explants de testicule de truite.

## **I - *gdnf-gfra1* pathway is expressed in a spermatogenetic dependent manner and is regulated by FSH in a fish testis. – Article 2**

Les mécanismes contrôlant l'auto-renouvellement ou la différenciation des cellules spermatogoniales souches sont peu connus, en particulier pour les espèces non-mammaliennes. Notre étude est la première menée sur l'analyse des régulations mises en jeu au sein de la niche germinale chez un téléostéen, à la fois localement par des facteurs paracrines, et au niveau périphérique par la régulation hormonale. En effet, après avoir identifié les orthologues truite de *gdnf*, un facteur connu pour son implication dans l'auto-renouvellement des SSCs, nous montrons que *gdnfb* (un des paralogues truite de *gdnf*) est exprimé dans le système nerveux central et dans le compartiment somatique du testicule de truite. A l'opposé, le transcrit du récepteur de *gdnf*, *gfra1a* (un des paralogues truites), est exprimé par les cellules germinales et préférentiellement dans la population de spermatogonies A indifférenciées de testicule immature.

Chez la truite, la spermatogenèse progresse selon un cycle annuel strict. *Gdnfb* et son récepteur, *gfra1a*, sont exprimés de façon spermatogénétique-dépendante. L'expression de *gfra1a* est la plus forte chez le juvénile et dans les stades précoces de la spermatogenèse puis diminue avec l'avancement de la spermatogenèse. A l'opposé, l'expression de *gdnfb* croît considérablement juste avant la fin de cycle, au moment où la différenciation des cellules germinales s'arrête au



---

profit de l'entrée en spermiation. Ce profil d'expression suggère alors un rôle de *gdnf* dans la répression de la spermatogenèse, *i.e.* l'arrêt de la prolifération des spermatogonies et la création de nouveaux cystes germinaux. Enfin, nous confirmons que la Fsh, un important régulateur de la spermatogenèse (dont la régulation du devenir des SSCs), stimule la prolifération des spermatogonies *A in vitro*. L'addition de Fsh conduit aussi à une stimulation de l'expression de *gfra1a* mais pas de son ligand, *gdnfb*. Au vu des résultats obtenus au cours de cette étude, nous émettons l'hypothèse que les spermatogonies positives pour *Gfra1* sont les probables spermatogonies souches chez la truite arc-en-ciel, et que la balance entre leur auto-renouvellement ou leur différenciation est sous le contrôle direct de *gdnfb* et sous contrôle périphérique de Fsh.



***gdnf-gfra1* pathway is expressed in a spermatogenetic dependent manner and is regulated by FSH in a fish testis.**

**Running title:** *gdnf* and *gfra1* are expressed in the fish testis

**Summary sentence:** *gfra1*, expressed by a sub-population of undifferentiated A-spermatogonia, and its receptor *gdnf*, expressed by some somatic cells, are regulated by Fsh in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) testis.

**Keywords:** spermatogonial stem cells, *gfra1*, *gdnf*, Fsh, rainbow trout

**Authors and affiliations:**

Johanna Bellaïche, Anne-Sophie Goupil, Jean-Jacques Lareyre, and Florence Le Gac

INRA, UR1037 Fish Physiology and Genomics, BIOSIT, Ouest-Genopole Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes, France

**Corresponding author:**

legac@rennes.inra.fr

Phone: (+33) 2 23 48 50 02

Fax: (+33) 2 23 48 50 20



---

## ***Abstract***

What makes the spermatogonial stem cells (SSCs) self-renew or differentiate to produce spermatozoa is barely understood, in particular in non-mammalian species. Our study is the first to explore possible regulation of the spermatogonial stem cell niche in teleost, locally by paracrine factors and peripherally by hormonal regulation. Indeed, after identifying the rainbow trout orthologs of *gnf*, a factor known for its implication in self-renewal of the SSCs in mammals, we showed that the paralog *gnfb* is expressed in the pituitary and testis somatic compartment in the trout. In contrast, the transcript of the *gnf* receptor, *gfra1*, was preferentially expressed in a population of undifferentiated A-spermatogonia purified from juvenile testes. In trout, spermatogenesis develops along a strict annual cycle. Both *gnf* and its receptor were expressed in a spermatogenetic activity dependent manner. *gfra1* was highest in juvenile and early stages then rapidly decreased when spermatogenesis progressed, while a dramatic increase of *gnfb* transcript coincided with the progressive stop in germ cell differentiation toward the end of the reproductive cycle. This result suggest its involvement in spermatogenesis repression. Finally, we found that Fsh, an important regulator of spermatogenesis including in the self-renewal of SSCs, stimulates A spermatogonia proliferation *in vitro*. Fsh treatment also increased the expression of *gfra1* in the trout, but not of its ligand, *gnfb*. According to the result obtained in this study, we hypothesize that the Gfra1 positive cells are putative SSCs in rainbow trout and that the balance between SSC renewal and differentiation is under direct regulation by Gdnf and peripherally by Fsh.



---

## ***Introduction***

Continuous or cyclic production of spermatozoa throughout life in adult male vertebrate rely on a sub-population of undifferentiated germ cells, the spermatogonial stem cells (SSCs). Despite the fact that SSCs have been discovered and studied for more than fifty years (Clermont and Leblond, 1959), their characteristics and the regulating factors involved in their fate have only partially been elucidated especially in non-mammalian vertebrates. GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor) has been proposed as one of the major regulator of mammalian SSCs self-renewal. *Gdnf* heterozygous knockout mice progressively lost their fertility with the total disappearance of spermatogonia (Meng et al., 2000). On the opposite, *gdnf* over-expression in the testis induced accumulation of undifferentiated A spermatogonia (Meng et al., 2001). This led to propose GDNF as a regulator of SSCs self-renewal and was further supported by in vitro studies in rodents (Hamra et al., 2005; Kubota et al., 2004), rabbit (Kubota et al., 2011) and bull (Aponte et al., 2008).

The cellular responses to GDNF are mediated by a multicomponent receptor complex consisting of RET receptor tyrosine kinase and a glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-linked ligand-binding subunit GFRA1 (Tomac et al., 2000). GFRA1 has been detected in the undifferentiated A spermatogonia population in numerous mammalian species like rodents (Dettin, 2003; Gassei and Orwig, 2013; Sato et al., 2011), domestic species like pig (Kuijk et al., 2010) and horses (Costa et al., 2012), but also primates like rhesus monkey (Phillips et al., 2010) (Gassei et al., 2010) and the human (He et al., 2010). Although GFRA1 expression is observed in all Aund spermatogonial types, its expression gradually decreases in mice as spermatogonial clones become larger, from isolated A cells (As) to aligned A cells (Aal) (Nakagawa et al., 2010; Suzuki et al., 2009).

Fsh regulates spermatogenesis in particular, through Sertoli cells over spermatogonial proliferation in mammalian (Meachem et al., 1999; Shetty et al., 1996) and in fish species (Loir, 1999a; Ohta et al., 2007). Interestingly, *in vitro*, Fsh stimulated *gdnf* expression by Sertoli cells in rodents (Simon et al., 2007; Tadokoro et al., 2002) and human testicular cell cultures (Ding et al., 2011). Moreover, when FSH signal is repressed in mice *in vivo*, the *gdnf* expression is reduced, also indicating that FSH supports *gdnf*, in a direct or indirect manner (Tadokoro et al., 2002).

Knowledge on the spermatogonial stem cells in fish species remains scarce. Recently, studies



---

in fish species allowed to get a clearer view on the spermatogonial heterogeneity on the morphological and molecular marker level. We recently found that, as in mouse, *nanos2* transcript is detected in a restricted sub-population of A-Spg that we proposed as the putative spermatogonial stem cells in rainbow trout (Bellaïche et al, 2013). Interestingly, *Gfra1* expression was reported in some undifferentiated spermatogonia in tilapia and dogfish (Bosseboeuf et al., 2013; Santos Nassif Lacerda et al., 2013). Zebrafish spermatogonial stem cells formed colonies and proliferated greatly if cultured on ovarian feeder cells expressing *Lif*, *Fgf2* and *Gdnf* (Wong and Collodi, 2013; Wong et al., 2011). These findings are promising to hypothesize a conservation of this pathway between distant phylogenetic species. However, both *gdnf* and *gfra1* expression profile have never been investigated in a comparative study in a teleost species. Moreover, the Fsh regulation of this pathway has never been demonstrated in the testis of non-mammalian species.

In trout, spermatogenesis occurs synchronously within cysts and the spermatogenic development of the testis follows a strict annual reproductive cycle that allows to study specific stages, like the spermatogonial proliferation, meiosis, spermiogenesis or sperm excretion (spermiation). We recently characterized a population of undifferentiated A –Spg at the morphological, molecular and functional level and identified putative SSCs in trout (Bellaïche et al, in press). The objective of the present study was to take advantage of the spatio-temporal organization of spermatogenesis in the trout to analyze the expression profile of the *gdnf-gfra1* pathway in vivo in relation to the spermatogenetic development. We also investigated the effects of Fsh on *gdnf* and *gfra1* expression and on A spermatogonia proliferation in vitro. Our results allow us to propose that the *gdnf-gfra1* pathway is possibly involved in the balance between self-renewal and differentiation of SSCs in trout and is directly or indirectly influenced by Fsh.



---

## ***Material and Methods***

### **Ethics Statement**

Experimental research on animal reported here was performed in conformity with the principles for the use and care of laboratory animals in compliance with French and European regulations on animal welfare. Furthermore, experimenters were delivered an authorization given by the French ‘‘Direction des Services Veterinaires’’ to conduct or supervise experimentation on live animals.

### **In silico sequences analysis**

Each trout paralog was thoroughly searched within nucleotidiques database of the rainbow trout EST (SIGENAE) and in the trout genome (GENOTROUT project). Tblastn with mouse and zebrafish genes was also conducted in other genome species. All sequences were subsequently aligned with clustal W and furthered proceed using Mega5. Using maximum likelihood test under Jones-Taylor-Thornton model and 1000 replication.

### **Animals and tissue sampling**

Male rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) were obtained from INRA experimental fish farm (PEIMA, Drennec) and kept in the laboratory facilities at 12°C under natural photoperiod. Fishes were anesthetized in 2-phenoxyethanol (10mg/ml water) and killed by a blow on the head. Tissues (brain, pituitary, heart, muscle, gill, stomach, liver, intestine, skin, spleen, and kidney) were sampled from pre-pubertal male trout. Sperm producing testes (from spawning males) and pre-vitellogenesis ovary from female rainbow trout were also collected. All tissues were sampled from at least three different individuals. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C until RNA extraction. In order to describe gene expression during spermatogenic development, testes were collected from one year old pre-pubertal fish (immature, stage I), and at different stages of the reproductive cycle (described in Gomez et al., 1999). Testes were recovered, weighed to determine the gonadosomatic index (GSI) and tissue were rapidly immersed in paraformaldehyde or Bouin's solution for further histological analyses, or frozen until RNA extraction. Accurate determination of testicular developmental stages was achieved by combining histological analysis of Bouin's solution fixed samples (on the basis of the most differentiated germ cell type present in the gonad) and GSI as previously described in details in Gomez et al., 1998, 1999b). Gonads from 4 to 5 individuals



---

in stages I, II, III-IV, V-VI, VII and VIII were used for RNA extraction.

### **Germ cell isolation**

Populations of germ cells at different stages of differentiation were obtained from immature males (stages I) or maturing males (stages III-IV) as previously described (Loir and Sourdain, 1994). In brief, testes were minced, submitted to enzymatic digestion followed by mechanical dispersion using a Dounce homogenizer. The resulting cell suspensions were filtered through nylon gauze (150µm, 50µm and 32µm pore size) and pelleted by centrifugation. The cell pellets were resuspended in L15 medium with 1% BSA, loaded onto 90% percoll gradients and centrifuged for 40min at 500g and 5 min at 50g to remove cell clusters, erythrocytes and most spermatozoa, if present. The upper floating layers were recovered and submitted to cell sorting by centrifugal elutriation (JE5 Beckman Instruments). Cell separation was performed at constant rotation speed (2000 rpm) and increasing flow rates in L15 media with 0.5% BSA. Germ cell fractions (described in Bellaiche et al, in press) were rinsed, pelleted and either transferred in Trizol reagent and stored at -80°C for RNA or used for immunochemistry experiments. The unsorted fraction enriched in somatic cells was cultured in synthetic L15 media as modified by (Loir, 1990). After three days, the supernatant containing dead cells and some spermatogonia was removed and replaced by hypo-osmotic media for 15min to further eliminate germ cells. The well was rinsed with PBS and replaced by Trizol reagent for qPCR experiments.

### **Real-time PCR analysis**

Total RNA was isolated using the Trizol reagent (Invitrogen) and further purified with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey Nagel EURL, Hoerd, France). RNA concentrations were quantified using the NanoDrop ND-10 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and RNA quality was determined using the Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). 500ng total RNA was reverse transcribed using random hexamers and the GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega). Quantitative Polymerase Chain Reactions (qPCR) were conducted using the StepOne Plus thermocycler (Applied Biosystems). Control reactions were performed without reverse transcriptase. Real-time PCR oligonucleotide primers (were designed using the Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) and were verified with the [oligoanalyser](http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) [3.1](http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) [web](http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) [interface](http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) to avoid self and heterodimer formation as well as hairpin structures. PCR amplification was performed on 1/10 diluted first-



---

strand cDNA templates, 1X Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) fluorescent dye and 600nM of each forward and reverse primers. The cycling conditions were as follows: 95°C for 20s, followed by 40 cycles at 95°C for 3s and 60°C for 30s. All RT samples were measured in duplicates. For the panel of tissues, gene expression level was normalized by *18s* gene expression and highest tissue expression was arbitrary set to 100. In testicular and cellular experiments, gene expression level was normalized by *rs15* gene expression (clone 1RT58B15\_B\_A08) and compared to stage I testis gene expression arbitrary set to 100. *rs15* was chosen on the basis of its invariant expression in all our previous experiments with the trout testis (Rolland et al., 2009, 2013). Efficiency of PCR amplification was verified using serial dilutions of pooled RT products and the melting curve analysis was performed at the end of each real time PCR assay to control the amplification of a single PCR product. Statistical analysis were performed through the R software environment using the non-parametric ANOVA of Kruskal-Wallis and the test U of Mann & Whitney if a statistical difference ( $p < 0.05$ ) was observed between groups in the ANOVA analysis.

### **Immunocytochemistry and flow cytometry experiments**

For immunocytochemistry, isolated testicular cells (obtained from immature testes containing only undifferentiated A-Spg) were deposited on L-polysine slides using Cytospin (Shandon, Waltham, MA, USA). The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton-100 for 3 min at room temperature. After washing, cells were incubated with 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Cells were then immunostained overnight at 4°C with an antibody against *gfra1* (SantaCruz, H-70) in PBS 1% BSA. Cells were washed and incubated with the secondary antibody. Analysis and image capture were done with a NIKON 90I fluorescent microscope equipped with DS Ri1 CCD camera and NIS AR software.

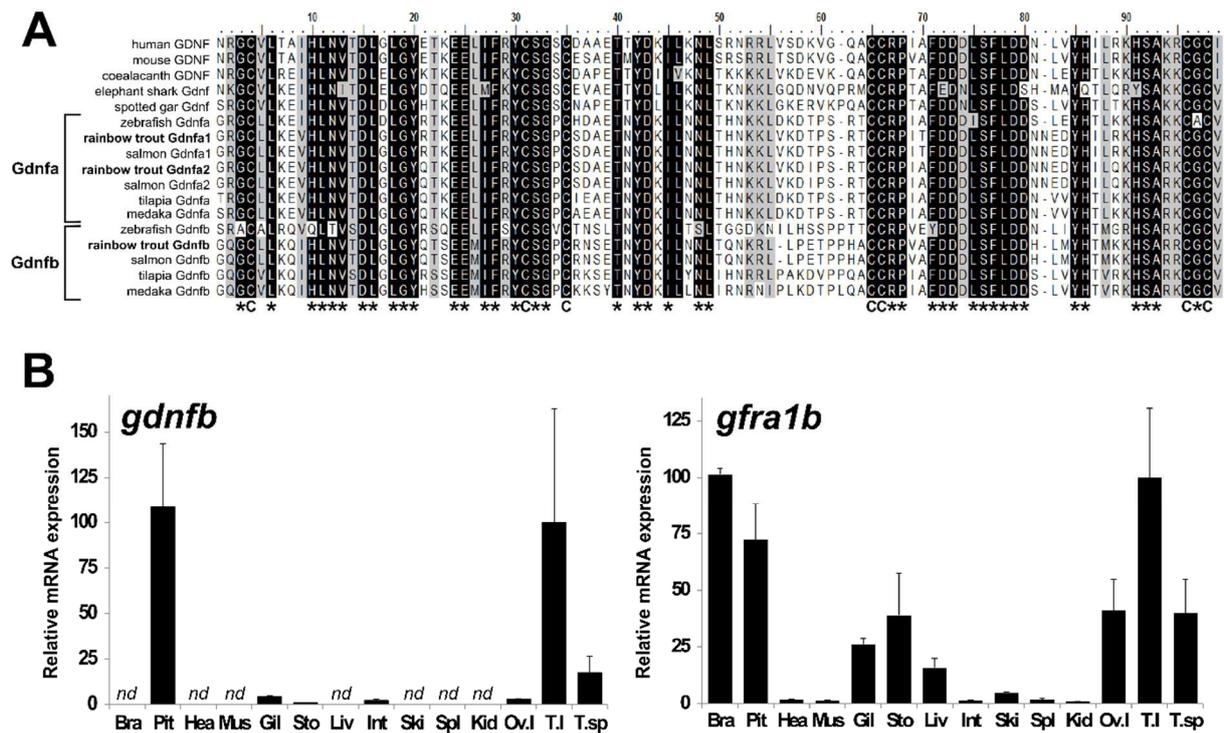
Flow cytometry was performed on undifferentiated A-Spg purified by centrifugal elutriation.  $10^6$  spermatogonia/ml were diluted in PBS plus 1% SVF and incubated for 1 hour at 4°C with anti-Gfra1 antibody (ab8026 abcam) or with rabbit IgG isotype (Novus Biological) biotin-conjugated (Milteny Biotech). After three short PBS washing, cells were incubated 15 min at 4°C with anti-biotin R-phycoerythrin conjugated antibody. Analysis were performed on a FACSCalibur™ (BD Biosciences) and processed with FlowCore package on Bioconductor using the R software environment.



---

### **Organotypic and primary testicular cell culture**

The explant experiment were conducted as previously reported (Sambroni et al, 2013). Briefly, gonads obtained from immature (stage I) or stage III-IV testis were collected, cut into 1 to 3 mm<sup>3</sup> pieces and pooled. Ten testicular fragments were randomly distributed per well with six replicate per condition. Explants were incubated in the absence or the presence of purified pituitary salmonid Fsh (500 ng/mL) for 96h, with medium and hormones change after 48h of incubation. At the end of the incubation, tissues were frozen at 80°C in Trizol reagent till RNA extraction.



**Figure 1** (Figure 32)

### *gdnf-gfra1* in the rainbow trout

**A.** Protein alignment of the predicted mature Gdnf.

**B.** Tissue expression of *gdnfb* and *gfra1b*. Real-time PCR analysis was conducted using total RNA from the following tissues: brain (Bra), pituitary (Pit), Heart (Hea), muscle (Mus), gill (Gil), stomach (Sto), liver (Liv), intestine (Int), skin (Ski), spleen (Spl), kidney (Kid), pre-vitellogenesis ovary (Ov.I), 1 year old immature testis (T.I) and spawning testis (T.sp). Gene expression level was normalized by *18s* gene expression and highest tissue expression was arbitrary set to 100. Mean and sem are shown (n=3/tissue), nd = not detected.

---

## Results

### Identification of the orthologs of *gdnf* and *gfra1* in rainbow trout

We identified three paralogs of the *gdnf* gene in the rainbow trout sequences as shown by the alignment of the predicted mature ligand part of the fish and mammals protein (figure 1A). Two forms of *gdnf* (*a* and *b*) are found in teleosts. Furthermore, in trout, as in salmon, we found two *gdnfa*, named *gdnfa1* and *gdnfa2* which likely correspond to the supplementary specific duplication of the salmonid genome. We found two *gfra1* genes in the trout sequences strongly similar. Those two gene probably originated from the salmonids genome duplication as illustrated in supplementary figures.

Despite sustained efforts, including attempts of cDNA cloning and qPCR using several primer couples specific for each paralogues, no expression of *gdnfa1* and *gdnfa2* nor of *gfra1b* could be demonstrated in testis or in the brain. In contrast, using real-time quantitative PCR analysis, *gdnfb* and *gfra1a* (figure 1B) were found preferentially expressed in trout brain and/or pituitary, and also in both gonads. Those results are consistent with the known expression of their mammalian homologs and thus consistent with a participation of the *gdnf*-*gfra1* pathway in the rainbow trout testis biology.

### Expression profile of *gdnfb* and *gfra1* during the spermatogenetic cycle

In trout, spermatogenesis is strongly governed by seasonality. In the early stage of each cycle (stage I), only slowly dividing undifferentiated A spermatogonia are present in the seminiferous tubules. During active spermatogenesis, rapid spermatogonial proliferation in synchronous cysts, then meiotic and spermiogenic differentiation, progressively spreads in the gonad from stage II to IV. Spermatogenesis will progressively stop from stage V to VII so that in stage VIII, corresponding to the spawning period, only spermatozoa and a few scattered putative spermatogonial stem cells are the only germ cell present in the seminiferous tubules. The resulting relative abundance of the different germ cell types observed in each stage is represented in table 1. In order to fully describe the expression profiles of both *gdnf* and *gfra1*, their transcripts were measured in 5 individual samples from each spermatogenetic stage. The expression profiles of *gsdf*, *vasa* and *rshl2*, known for their expression in Sertoli cells, spermatogonia and meiotic germ cells respectively were used as comparison.

The expression of *gdnfb* was detected at relatively low level and tended to decrease from stage

Stages	Und A-Spg	B-Spg	Spocyte	Sptid	Spzoa	Sperm excretion
I	+++					
II	+++	+				
IIIa	++	++	+			
IIIb	++	+++	++	+		
IV	+	+++	++++	++	+	
V	(+)	++	+++	++++	++	
VI	(+)	+	++	+++	+++	
VII	(+)	(+)	+	+	+++++	(+)
VIII	(+)				+++(++)	+ to ++++

**Table 1**

**Semi-quantitative evaluation of germ cell types relative abundance in rainbow trout seminiferous tubules, and sperm excretion, over the reproductive cycle.**

+ to +++++ indicates the relative abundance of each germ cell type observed during histological examination. (+) = rare. I to VIII = stages of gonadal development over the reproductive cycle.

---

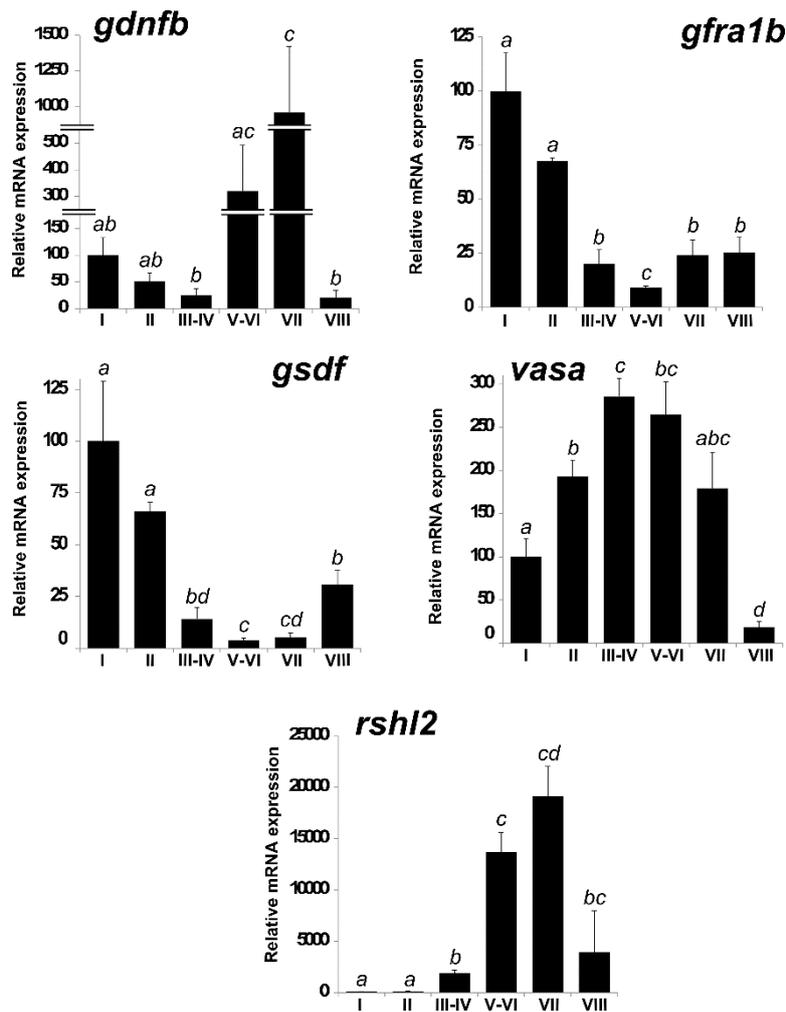
I to IV corresponding to the rapid proliferation and differentiation of germ cells (figure 2). Increasing numbers of germ cells is reflected by the increased *vasa* expression at those stages (figure 2). Interestingly, *gdnfb* expression dramatically raised in later stages of the spermatogenic development, stage IV to VII, when spermatogonia amplification progressively ceases (table 1), while post-meiotic germ cells and spermatozoa accumulate as reflected by the elevated *rshl2* expression. In comparison, *gsdf1*, a TGFbeta member specific of the teleost species and known to stimulate early germ cell proliferation (Shibata et al., 2010), exhibited a quite different expression profile, with the highest levels in stage I and a continuous decrease during the spermatogenic development comforting a role for this gene linked to the proliferation of the A spermatogonia in the immature testis. The *gdnf*-receptor transcript, *gfra1a*, was highly expressed in the earlier stage of the spermatogenic cycle where undifferentiated A spermatogonia are abundant and are the only germ cells in the testis, then rapidly decreased during germ cell amplification and differentiation.

### **Cellular localization of the expression**

We then explored the *gdnf* and *gfra1* expression in isolated trout germ and somatic cell populations. In particular, three populations of somatic cells were used: blood cells as negative control, a primary culture of a cell population isolated from immature testes and enriched in somatic cells as explained in M&M and containing Sertoli cells, and a rainbow trout testicular cell line, RTG2 (Figure 3A). *gsdf1* is specifically expressed in trout Sertoli cells and its expression was high in the primary somatic cell culture reflecting the presence of Sertoli cells in this population. No or small expression of this gene was detected in the other somatic and germ cell fractions. In contrast, *gdnf* was strongly expressed in the RTG2 cell line while its expression was low -although above detection threshold- in the other cell fractions. Those results do not support the potent expression of *gdnf* by Sertoli cells but rather by another somatic cell type in the trout testis.

By comparison, *gfra1a* was highly expressed in the undifferentiated A spermatogonia isolated from immature but also from mature testis. A significant expression of this transcript was also detected in the somatic cell culture that is explained by the presence of up to 40% contaminating spermatogonia in this fraction.). On the other side and consistent with their known roles in germ cells, *vasa* was highly expressed in A spermatogonia and decreased very gradually with germinal differentiation, while *rshl2* was highly express in meiotic cells. Note that *vasa* was also detected in the somatic cell primary culture contaminated with spermatogonia.

A heterologous antibody targeting a conserved epitope between mouse and the predicted protein



**Figure 2 (Figure 33)**

### Gene expression in whole testicular tissue during the spermatogenic cycle

Expression profiles were monitored by real-time qPCR in rainbow trout testicular samples. The samples are ordered according to the natural time course of spermatogenesis, immature (stage I, 1 year old), maturing (from stage II to stage VII) and spawning (sp, stage VIII). Gene expression level were normalized by *rs15* gene expression and 1 year old immature testis expression was arbitrary set to 100. Mean and sem are shown (n=4-5). Different letters indicate significantly different levels of expression at  $p < 0,05$ .

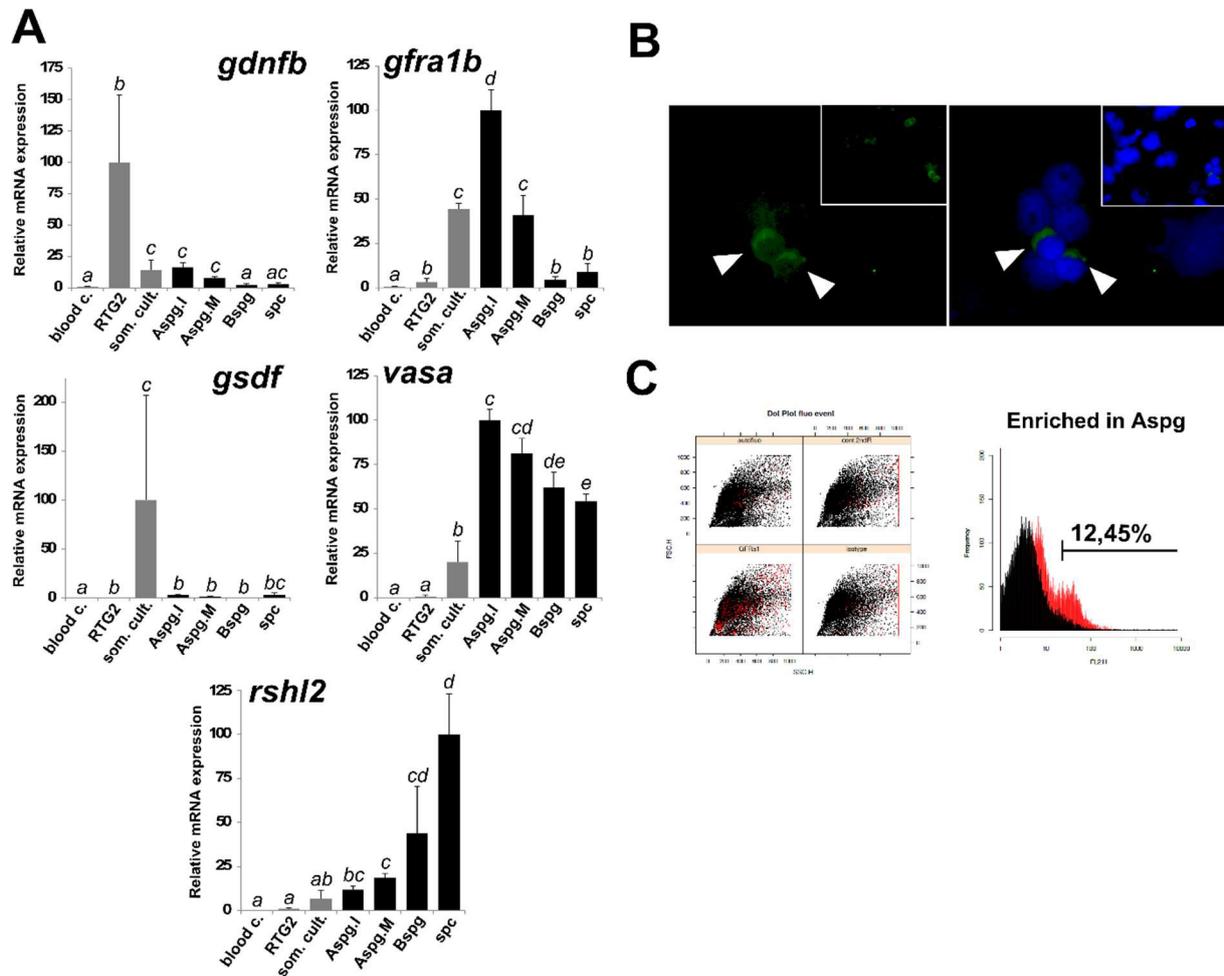
---

in rainbow trout was used to confirm the protein expression of Gfra1 in the testicular cells from immature testis. In agreement with the specific transcript expression in the spermatogonia, staining was detected at the membrane of some spermatogonia of cytopspined immature testicular cells (figure 3B). Finally, by flow cytometry analysis, we attempted to quantify the proportion of undifferentiated A spermatogonia expressing Gfra1 (figure 3C). Among the spermatogonia population purified by centrifugal elutriation containing more than 90% of undifferentiated A-Spg (as identified by classical histology on morphological criteria), only 10 to 15% (3 experiments) of the cells expressed the Gfra1 protein. Thereby, this result indicates that Gfra1 is expressed in a small subset of the undifferentiated A spermatogonia cells, in agreement with its expression profile in mammals by the spermatogonial stem cells.

### ***In vitro* Fsh action on gene expression and cell proliferation**

Actions of rainbow trout Fsh on the relative expression of these transcripts were analyzed *in vitro* on cultured testicular explants. As compared to the pre-culture value, the expression of *gdnfb* had significant increased by 1.5 fold after four days of culture in the absence of hormonal stimuli. However this elevation was abolished in the presence of Fsh suggesting some direct or indirect action of this gonadotropin on the *gdnf* transcript steady state (figure 4A). This result was confirmed in three independent experiments using either stage I or stage III-IV testes. Moreover no significant difference between untreated and treated well with Fsh were observed after shorter culture times (4, 8, 18 to 48). In contrast, the Gdnf receptor, *gfra1a*, was repeatedly and strongly up-regulated by Fsh treatment and a 2 fold increase was observed after 96h of culture.

We then tested whether the Fsh effects on the expression of *gdnf* and its receptor described here could be related with changes in the A spermatogonia proliferation. We set up a co-culture of somatic testicular cells and A spermatogonia isolated from immature males as previously described (Loir, 1999b). Purified A spermatogonia cultured alone hardly attach to the culture plates even in the presence of gelatin, while they strongly attach on the surface of the spread somatic cells in co-cultures. As shown in figure 4 (A-C), spermatogonia are clearly distinguishable from somatic cell. Spermatogonia tend not to flatten and exhibit a round, smaller and denser nucleus than the somatic cells, while these cells rapidly attach to the plate and after 2 to 5 days in culture exhibit a large, flattened and ovoid nucleus and a widespread cytoplasm. After 5 days in culture we observed clusters and chains of more than two spermatogonia, but pairs and isolated were also often detected. Spermatogonia are stuck on the



**Figure 3** (Figure 34)

### Germ cell gene expression

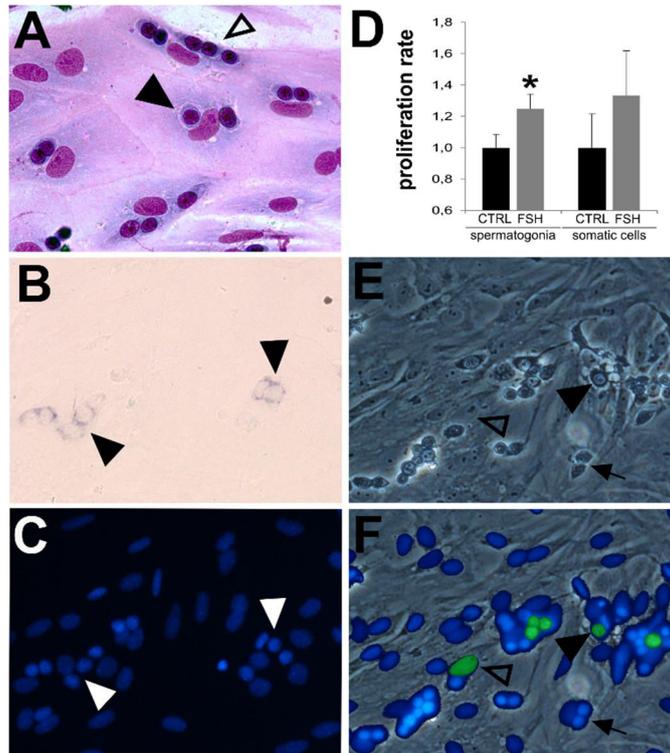
A. Expression profiles were monitored by real-time qPCR in rainbow trout testicular cell fraction: blood cells (blood c.), Rainbow Trout Gonadal cell line 2 (RTG2), somatic cell culture (som. cult.) and germ cells sorted by centrifugal elutriation: undifferentiated A spermatogonia from immature testis (Aspg.I), A spermatogonia from adult testis (Aspg.M), B spermatogonia (Bspg), spermatocytes (spc). Gene expression level were normalized by *rs15* and highest cellular expression was arbitrary set to 100. Mean and sem are shown (n = 4-5). Different letters indicate significantly different levels of expression at  $p < 0,05$ .

B. Immunocytochemistry reveals Gfra1 protein expression in the membrane of some germ cells.

C. Gfra1 protein detection in a sub-population of enriched A spermatogonia cells

---

surface of the somatic cells but sometimes they are more or less included in between somatic cells similar to the in vivo germinal niche, ie Sertoli cells totally surrounding the spermatogonia. Having verified that BrdU incorporation over a 24hrs period at 12°C allowed to observe cell proliferations, we analyzed the impact of Fsh on cell proliferation after 5 days of culture in the presence or absence of 100ng/ml purified trout Fsh. Fsh stimulation increased the proliferation index of the somatic cells (not significant) but more interestingly; it stimulated significantly the proliferation of the spermatogonia (Figure 4D-F).



**Figure 4** (Figure 35)

### Testicular culture

A. May-grundwald coloration.

B. Vasa detection in spermatogonia by HIT.

C. Hoechst staining.

D. FSH effect on the proliferation of spermatogonia and somatic cells

E. Phase contrast.

F. BrdU proliferative cells.

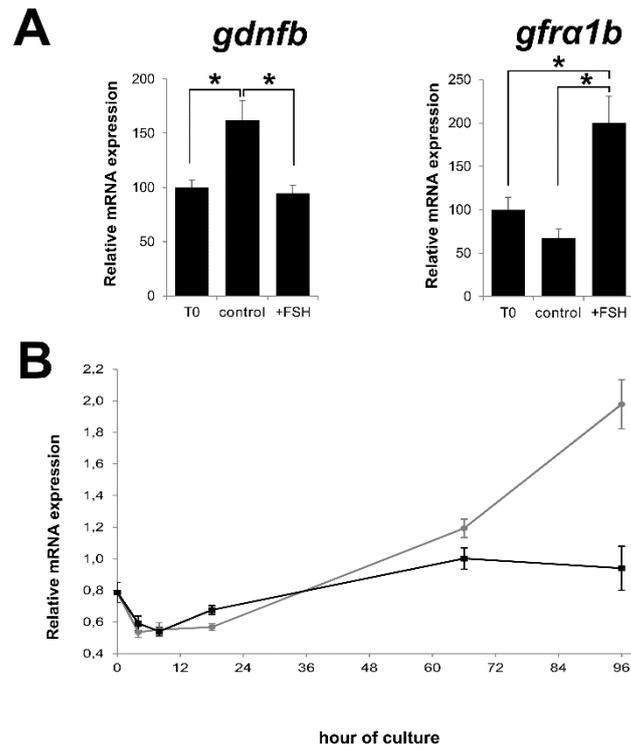
---

## ***Discussion***

We used the model of cyclic spermatogenetic development in trout to explore the regulation of the SSC niche in fish, locally by potential somatic secreted factors and peripherally by hormonal regulation. We identified the rainbow trout orthologs of the genes coding for *gdnf* and of its receptor *gfra1* a pathway known for its implication in self-renewal of the SSCs in mammals (Kubota et al., 2004, 2011; Meng et al., 2000) then studied their expression. We showed that it is expressed in the trout testis probably by somatic cells. In contrast, Gfra1 (*gdnf* receptor) is detected in a sub-population of undifferentiated spermatogonia similar to the *Gfra1* expression profile in mammals and other fish species testis (Bosseboeuf et al., 2013; Santos Nassif Lacerda et al., 2013). Finally, we found that Fsh, an important regulator of spermatogenesis including the self-renewal of SSC (Tadokoro et al., 2002), can stimulate spermatogonia proliferation and increase *gfra1* expression but not of its ligand, *gdnf*. According to the result obtained in this study, we hypothesize that the Gfra1 positive cells include the spermatogonial stem cells in rainbow trout and that their proliferation are under direct regulation by Gdnf and peripherally by Fsh.

### **Gfra1 is expressed in a sub-population of undifferentiated A spermatogonia**

Only one *gfra1*, *gfra1a*, was detected in the testis. More precisely, we found high expression of this transcript in early testicular developmental stages. In trout, spermatogenesis occurs synchronously within cysts and the spermatogenic development of the testis follows a strict annual reproductive cycle. In early testicular developmental stages, spermatogonia A and B are the most abundant germ cells in the testis. Thus, high expression of *gfra1a* at stage I to III relate to its involvement in spermatogonia biology. In a previous work (Bellaiche et al, in press), we showed that undifferentiated A spermatogonia isolated cells (from immature and mature testis) have high expression of the trout homologs for *nanos2*, *plzf* and *pou2*, three recognized markers of the most undifferentiated spermatogonia and putative SSCs in other vertebrates. Moreover, by transplantation assay, the high potential of colonization and participation to the recipient spermatogenesis of the undifferentiated A spermatogonial fraction was confirmed reflecting the presence of spermatogonial stem cells in the transplanted cell fraction. Interestingly, here, we found a preferential expression of *gfra1a* in the undifferentiated A-Spg population strongly supporting a role of *gfra1a* in the spermatogonia biology. Furthermore, by immunocytochemistry and flow-cytometry, protein expression of Gfra1 was detected on the



**Fsh *in vitro* treatment (Figure 36)**

A. In vitro effect of 96h Fsh treatment on gene expression (qPCR).

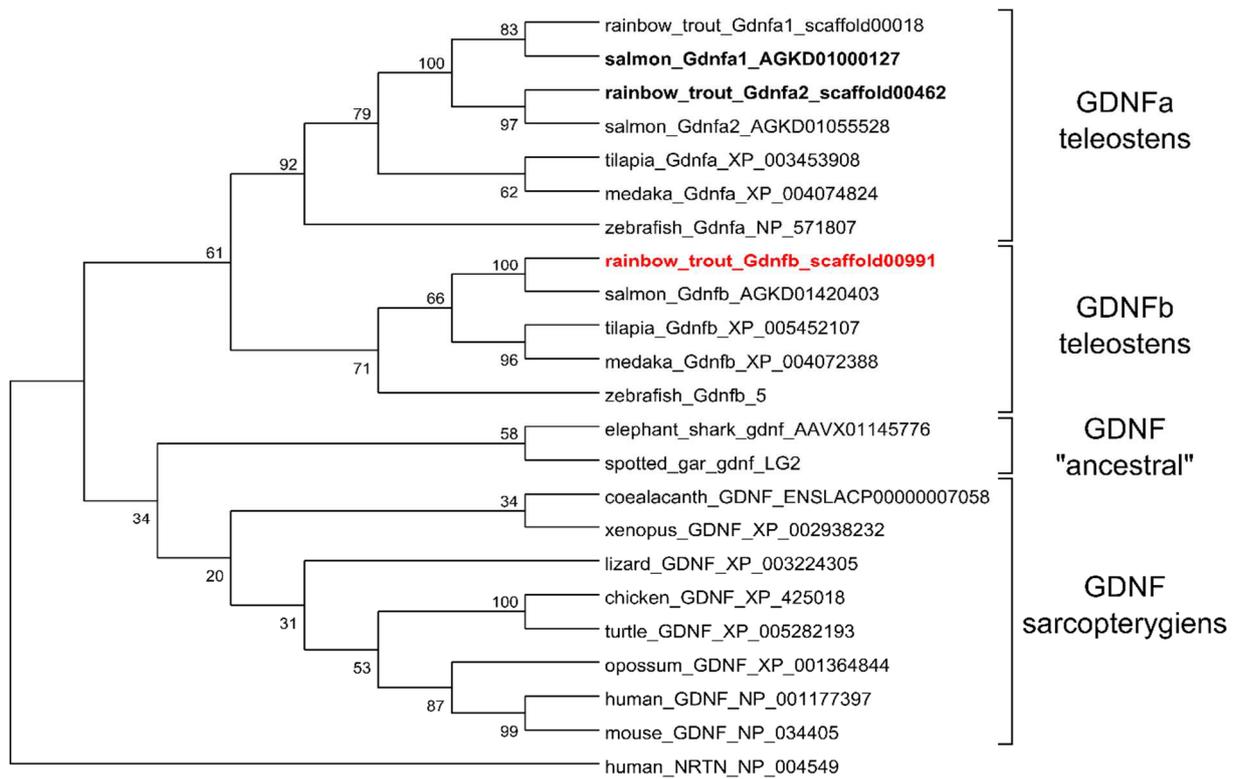
B. Time-course effect of Fsh treatment on gdnf expression. Black line, expression in control well; Grey line, expression in Fsh treated well.

---

surface membrane of less than 15% of the undifferentiated A spermatogonia population. This is consistent with the expression and role of this receptor in many mammalian species. In rodent, GFRA1 is expressed by most A single (As) cells and this expression decreases as spermatogonial clone grow till A aligned spermatogonia (Aal). to a A aligned (Aal) cells (Dettin, 2003; Hofmann et al., 2005), and is also detected in the most undifferentiated spermatogonia in other species like pig (Kuijk et al., 2010), horses (Costa et al., 2012) (Costa et al., 2012), and man (He et al., 2012). Using a heterologous antibody recognizing the conserved sequence between mouse and tilapia, the *Gfra1* protein was previously detected in most single type A spermatogonia proposed as the spermatogonial stem cells in this teleost specie (Santos Nassif Lacerda et al., 2013). Moreover, by in situ hybridization, *gfra1* was observed in the undifferentiated A spermatogonia of the testicular germinative zone of the dogfish (Bosseboeuf et al., 2013). From our results and the above mentioned studies we propose that the *Gfra1* positive spermatogonia represent the putative spermatogonial stem cells of rainbow trout. Finally, specific expression of *Gfra1* (transcript and/or protein) in some undifferentiated spermatogonia in phylogenetically distant species strongly support the hypothesis of the conservation of the *gfra1-gdnf* pathway in the regulation of early spermatogenesis process.

### ***gdnf* is expressed in a spermatogenetic activity-dependent manner**

The ligand of *Gfra1*, *Gdnf*, was also investigated in this study. *gdnfb* was the only trout paralog detected in testis but also in the central nervous system. Such expression is consistent with the well-known role of GDNF in the neurogenesis (Kobayashi et al, 2006) and in the control of maintenance of the SSC pool (Hofmann et al., 2005; Kubota et al., 2004; Meng et al., 2000). More precisely in the trout testis, low transcript expression was detected in a testicular somatic cells culture (including Sertoli cells) while high expression was observed in mRNA isolated from the rainbow trout gonadal cell line, RTG2 (Wolf and Quimby, 1962). These fibroblastic like cells are derived from testis as shown by the presence of *sdyc* in their genome, a gene specifically contained in the rainbow trout Y chromosome (Yano et al., 2012). By contrast, *gsdf* a *tgf-beta* member specific of the teleost clade and expressed by the Sertoli cells (Lareyre et al., 2008; Shibata et al., 2010) was detected here in the testicular somatic cell culture containing Sertoli cells but not in the RTG2 cell line. Those results imply that, at least in early stages of the trout spermatogenetic development *gdnf* is likely expressed by a somatic cell type present in the testis other than Sertoli cells. In contrast, in mammals, *gdnf* mRNA and protein are regarded as specifically expressed in Sertoli cells in rodents (Hellmich et al., 1996; Johnston et



**Supplemental Figure 1** (Figure 37)

Phylogenetic tree relating *gdnf* evolution in vertebrates.

---

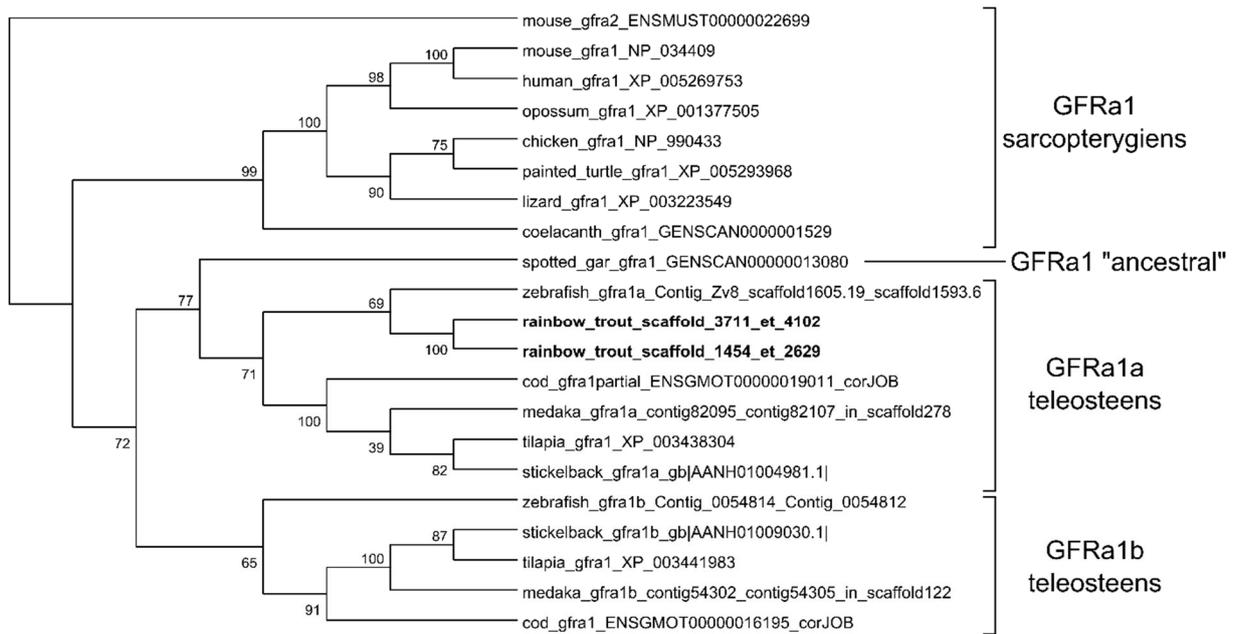
al., 2011) however this point is conflicted as another team showed rat *gdnf* expression also in other somatic and germ cells (Fouchécourt et al., 2006). Moreover, it may not apply to all species since GDNF was found produced by human peritubular cells (Spinnler et al., 2010). Further *in situ* studies are engaged to demonstrate the intra- testicular localization of Gdnf in fish.

We established that the *gdnf* transcript relative abundance presents marked changes along the annual spermatogenic cycle. A decrease in *gdnf* relative expression is observed in the early gonadal stages (I to III-IV) that is explained by the decreasing somatic to germ cells ratio, due to the rapid germ cell accumulation (B-Spg) observed at these stages and reflected by the increased vasa expression. This phenomenon has already been reported for other somatic genes in the trout testis (Rolland et al., 2009). More interestingly, later on, the *gdnf* transcript level dramatically increases towards the end of the spermatogenic cycle, before to brutally drop in the spawning stage VIII. Between stage IV and VII, spermatogenesis progressively stop. The number of cysts containing differentiated and rapidly proliferating B-spermatogonia drops revealing that a decreasing number of progenitors enter differentiation (table 1; (Billard, 1986; Gomez et al., 1999). Then, at the spawning stage (stage VIII), only spermatozoa are present in the tubules lumen while scarce and inactive undifferentiated A spermatogonia (isolated or by pairs) remain on the tubular wall (Bellaiche et al, in press). These cells are regarded as the adult spermatogonial stem cells that will support the gamete production in the next reproductive cycle. In regard to those cyclic changes in the trout, the increasing expression of *gdnf* when spermatogonial differentiation progressively stops supports an implication of this factor to repress spermatogonial differentiation. Although it is more speculative, it could also result in increased SSCs self-renewal and boost the pool of stem cells and/or progenitors just before the testis enter a long period of spermatogenic arrest (2-4 months).

In a seasonal mammal, the hamster, *gdnf* expression also changes in a spermatogenic activity-dependent manner with a reduction of its expression in the inactive stages (Sato et al., 2011). Thus in seasonal species like trout or hamster, *gdnf* is not secreted continuously to maintain the SSCs pool but rather have a cyclic dependent expression probably related to the balance between SSC renewal and differentiation.

### **Fsh stimulates spermatogonia proliferation and *gfra1* expression but not *gdnf***

The increased level of *gdnf* just before the end of the spermatogenic cycle coincides with a



**Supplemental Figure 2 (Figure 38)**

Phylogenetic tree relating *gfra1* evolution in vertebrates.

---

dramatic increase of Fsh blood plasma concentrations (Gomez et al., 1999) suggesting a positive regulation of *gdnfb* by this hormone in accordance with the demonstrated stimulation of *gdnf* expression following FSH treatment in mouse (Tadokoro et al., 2002). Surprisingly, here we found no stimulation of *gdnfb* expression after Fsh in three independent in vitro experiments using immature trout testicular explant. This is quite different from the situation observed in mammals, or at least in rodents. Indeed, Takodoro *et al* showed that FSH stimulated *gdnf* transcript expression in a primary Sertoli cell culture (Tadokoro et al., 2002). In mice increased mRNA expression were observed in a time-course dependent manner from 3 to 24 hours of FSH treatment (Simon et al, 2007) and until at least seven days of treatment (Ding et al, 2004). Conversely, here, we find that Fsh action repeatedly affected *gdnfb* transcript to maintain its initial pre-culture level, preventing the up regulation of this transcript that normally occurs over culture time (4 days). Interestingly, in mammals FSH regulates spermatogenesis through its action on Sertoli cells exclusively (Takodoro et al, 2002) while in fish, not only Sertoli but also Leydig cells can respond to Fsh (Ohta et al., 2007; Sambroni et al., 2007, 2013). In our study, we showed that in trout *gdnf* is probably not expressed by Sertoli cells and therefore the Fsh regulation of *gdnf* may reflect its action on Leydig cells and is possibly mediated by steroid secretion. Finally, the mechanism and significance of the down regulatory effect observed in vitro in this study remain unknown and will deserve more investigation since it is not in agreement with a positive relation between Fsh and *gdnf* transcript suggested in vivo.

Meanwhile, the *gdnf* receptor, *gfra1*, was repeatedly up stimulated by Fsh treatment. This is the first demonstration that Fsh regulates a gene critical in SSC biology in a non-vertebrate species. Moreover, when undifferentiated A spermatogonia from juvenile trout were co-cultured with testicular cells we detected a stimulation of spermatogonia proliferation after five days of Fsh treatment. Those results are consistent with the stimulation by FSH of spermatogonial proliferation reported in mammals ((McLean et al., 2002; Meachem et al., 1999) and in fish (Loir, 1999a; Ohta et al., 2007). Thus we can hypothesize that Fsh stimulation of the undifferentiated spermatogonia proliferation results in part from an increased receptivity of these cells to *gdnf*.

In summary, the expression of *Gfra1* in a sub-population of the most undifferentiated spermatogonia, and the expression of *gdnfb* possibly by the somatic component of the trout testis strongly imply the conservation of this pathway in the spermatogonial niche of teleosts. However, the role and regulation of this pathway in trout could somewhat differ from those proposed so far in mammals. The marked increase of *gdnf* expression coinciding with the



---

progressive stop of spermatogenetic activity towards the end of the trout reproductive cycle, suggests that *gdnf* is involved in the repression of spermatogonial differentiation prior to the period of testis quiescence. Furthermore, our data support the hypothesis that part of Fsh stimulation of the undifferentiated A-Spg proliferation is based on a positive control over the *gdnf* receptor.



---

## References

- Aoki, Y., Nakamura, S., Ishikawa, Y., and Tanaka, M. (2009). Expression and syntenic analyses of four nanos genes in medaka. *Zoolog. Sci.* *26*, 112–118.
- Aponte, P.M., Soda, T., Teerds, K.J., Mizrak, S.C., van de Kant, H.J.G., and de Rooij, D.G. (2008). Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reprod. Camb. Engl.* *136*, 543–557.
- Beer, R.L., and Draper, B.W. (2013). nanos3 maintains germline stem cells and expression of the conserved germline stem cell gene nanos2 in the zebrafish ovary. *Dev. Biol.* *374*, 308–318.
- Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Dev.* *26*, 877–920.
- Bosseboeuf, A., Gautier, A., Auvray, P., Mazan, S., and Sourdain, P. (2013). Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *Reprod. Camb. Engl.*
- Costa, G.M.J., Avelar, G.F., Rezende-Neto, J.V., Campos-Junior, P.H.A., Lacerda, S.M.S.N., Andrade, B.S.C., Thomé, R.G., Hofmann, M.-C., and Franca, L.R. (2012). Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *PloS One* *7*, e44091.
- Detin, L. (2003). Morphological Characterization of the Spermatogonial Subtypes in the Neonatal Mouse Testis. *Biol. Reprod.* *69*, 1565–1571.
- Ding, L.-J., Yan, G.-J., Ge, Q.-Y., Yu, F., Zhao, X., Diao, Z.-Y., Wang, Z.-Q., Yang, Z.-Z., Sun, H.-X., and Hu, Y.-L. (2011). FSH acts on the proliferation of type A spermatogonia via Nur77 that increases GDNF expression in the Sertoli cells. *FEBS Lett.* *585*, 2437–2444.
- Fouchécourt, S., Godet, M., Sabido, O., and Durand, P. (2006). Glial cell-line-derived neurotrophic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J. Endocrinol.* *190*, 59–71.
- Gabillard, J.-C., Rallièrè, C., Sabin, N., and Rescan, P.-Y. (2010). The production of fluorescent transgenic trout to study in vitro myogenic cell differentiation. *BMC Biotechnol.* *10*, 39.
- Gassei, K., and Orwig, K.E. (2013). SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. *PloS One* *8*, e53976.
- Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., and Le Gac, F. (1999). Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* *113*, 413–428.
- Hamra, F.K., Chapman, K.M., Nguyen, D.M., Williams-Stephens, A.A., Hammer, R.E., and Garbers, D.L. (2005). Selfrenewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17430–17435.
- He, Z., Kokkinaki, M., Jiang, J., Dobrinski, I., and Dym, M. (2010). Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol. Reprod.* *82*, 363–372.



- 
- He, Z., Kokkinaki, M., Jiang, J., Zeng, W., Dobrinski, I., and Dym, M. (2012). Isolation of human male germ-line stem cells using enzymatic digestion and magnetic-activated cell sorting. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 825, 45–57.
- Hellmich, H.L., Kos, L., Cho, E.S., Mahon, K.A., and Zimmer, A. (1996). Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech. Dev.* 54, 95–105.
- Hofmann, M.-C., Braydich-Stolle, L., and Dym, M. (2005). Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev. Biol.* 279, 114–124.
- Johnston, D.S., Olivas, E., DiCandeloro, P., and Wright, W.W. (2011). Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol. Reprod.* 85, 763–769.
- Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16489–16494.
- Kubota, H., Wu, X., Goodyear, S.M., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 2604–2614.
- Kuijk, E.W., de Gier, J., Lopes, S.M.C. de S., Chambers, I., van Pelt, A.M.M., Colenbrander, B., and Roelen, B.A.J. (2010). A distinct expression pattern in mammalian testes indicates a conserved role for NANOG in spermatogenesis. *PloS One* 5, e10987.
- Lacerda, S.M.S.N., Costa, G.M.J., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., and França, L.R. (2013). Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 3–11.
- Lareyre, J.-J., Ricordel, M.-J., Mahe, S., Goupil, A.-S., Vizziano, D., Bobe, J., Guiguen, Y., and Le Gac, F. (2008). Two new TGF beta members are restricted to the gonad and differentially expressed during sex differentiation and gametogenesis in trout. *Cybium* 32, 202–202.
- Loir, M. (1990). Trout steroidogenic testicular cells in primary culture. I. Changes in free and conjugated androgen and progestagen secretions: effects of gonadotropin, serum, and lipoproteins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 374–387.
- Loir, M. (1999a). Spermatogonia of rainbow trout: II. in vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 434–442.
- Loir, M. (1999b). Spermatogonia of rainbow trout: I. Morphological characterization, mitotic activity, and survival in primary cultures of testicular cells. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 422–433.
- McLean, D.J., Russell, L.D., and Griswold, M.D. (2002). Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* 66, 1374–1379.



- 
- Meachem, S.J., Mclachlan, R.I., Stanton, P.G., Robertson, D.M., and Wreford, N.G. (1999). FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. *J. Androl.* *20*, 756–762; discussion 755.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., et al. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* *287*, 1489–1493.
- Meng, X., de Rooij, D.G., Westerdahl, K., Saarma, M., and Sariola, H. (2001). Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse testis. *Cancer Res.* *61*, 3267–3271.
- Muffato, M., Louis, A., Poisnel, C.-E., and Crollius, H.R. (2010). Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. *Bioinformatics* *26*, 1119–1121.
- Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R.E., and Yoshida, S. (2010). Functional Hierarchy and Reversibility Within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. *Science* *328*, 62–67.
- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., and Miura, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol. Reprod.* *77*, 970–977.
- Phillips, B.T., Gassei, K., and Orwig, K.E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *365*, 1663–1678.
- Rodriguez-Sosa, J.R., Tang, L., and Dobrinski, I. (2013). Testicular tissue grafting and male germ cell transplantation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *927*, 489–500.
- Rolland, A., Goupil, A.S., Chalmel, F., Houlgatte, R., Lareyre, J.J., and Le Gac, F. (2009). Identification of Androgen- Responsive Genes in Fish Testis: Relevance to the Male Gonad Development and the Regulation of Spermatogenesis. *J. Androl.* *30*, 131–131.
- Rolland, A.D., Lardenois, A., Goupil, A.-S., Lareyre, J.-J., Houlgatte, R., Chalmel, F., and Le Gac, F. (2013). Profiling of androgen response in rainbow trout pubertal testis: relevance to male gonad development and spermatogenesis. *PloS One* *8*, e53302.
- Sambroni, E., Le Gac, F., Breton, B., and Lareyre, J.-J. (2007). Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. *J. Endocrinol.* *195*, 213–228.
- Sambroni, E., Rolland, A.D., Lareyre, J.-J., and Le Gac, F. (2013). Fsh and Lh have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. *J. Mol. Endocrinol.* *50*, 1–18.
- Santos Nassif Lacerda, S.M., Costa, G.M.J., da Silva, M. de A., Almeida Campos-Junior, P.H., Segatelli, T.M., Peixoto, M.T.D., Resende, R.R., and de França, L.R. (2013). Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* *192*, 95–106.
- Sato, T., Aiyama, Y., Ishii-Inagaki, M., Hara, K., Tsunekawa, N., Harikae, K., Uemura-Kamata, M., Shinomura, M., Zhu, X.B., Maeda, S., et al. (2011). Cyclical and patch-like GDNF



---

distribution along the basal surface of Sertoli cells in mouse and hamster testes. *PloS One* 6, e28367.

Shetty, J., Marathe, G.K., and Dighe, R.R. (1996). Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 137, 2179–2182.

Shibata, Y., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Usami, T., Nakamoto, M., Matsuda, M., and Nagahama, Y. (2010). Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expr. Patterns GEP* 10, 283–289.

Simon, L., Ekman, G.C., Tyagi, G., Hess, R.A., Murphy, K.M., and Cooke, P.S. (2007). Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp. Cell Res.* 313, 3090–3099.

Spinnler, K., Köhn, F.M., Schwarzer, U., and Mayerhofer, A. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25, 2181–2187.

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

Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., and Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech. Dev.* 113, 29–39.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

Tomac, A.C., Grinberg, A., Huang, S.P., Nosrat, C., Wang, Y., Borlongan, C., Lin, S.Z., Chiang, Y.H., Olson, L., Westphal, H., et al. (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha1 availability regulates glial cell line-derived neurotrophic factor signaling: evidence from mice carrying one or two mutated alleles. *Neuroscience* 95, 1011–1023.

Venkatesh, B., Lee, A.P., Ravi, V., Maurya, A.K., Lian, M.M., Swann, J.B., Ohta, Y., Flajnik, M.F., Sutoh, Y., Kasahara, M., et al. (2014). Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* 505, 174–179.

Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2003). dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol. CB* 13, 1429–1434.

Wolf, K., and Quimby, M.C. (1962). Established Eurythermic Line of Fish Cells in vitro. *Science* 135, 1065–1066.

Wong, T.-T., and Collodi, P. (2013). Effects of specific and prolonged expression of zebrafish growth factors, Fgf2 and Lif in primordial germ cells in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 347–351.



---

Wong, T.-T., Saito, T., Crodian, J., and Collodi, P. (2011). Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae. *Biol. Reprod.* 84, 1190–1197.

Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., and Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr. Biol. CB* 22, 1423–1428.

Zohni, K., Zhang, X., Tan, S.L., Chan, P., and Nagano, M.C. (2012). The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27, 44–53.



---

## II – Résultats complémentaires

### *Implication de la voie ckit-kit ligand au sein du testicule de truite*

En parallèle au rôle de la voie GDNF et GFRA1, nous avons procédé aux mêmes analyses pour la voie CKIT et KIT LIGAND. En effet, tandis que *gdnf* et *gfra1* sont impliqués pour maintenir l'auto-renouvellement des SSCs, CKIT et KIT LIGAND sont considérés comme stimulateurs de la prolifération des cellules différenciées chez la souris adulte.

#### **Introduction**

L'étude des souris mutantes au locus White spotting W (codant pour *c-kit*) et dans le locus Steel Sl (codant pour kit ligand) ont permis de mettre en évidence le rôle clé de *ckit/kit* ligand dans le développement des cellules germinales. Il y a en effet une variété et une sévérité des mutants des locus *W/W* et *Sl/Sl* chez la souris. Pour certains il n'y a plus du tout de cellules germinales tandis que pour d'autre les souris sont fertiles (Koshimizu et al, 1992). Par exemple, chez les mutants *Sll7H/Sll7H*, la transition entre A1 et A1 est inhibée (De Rooij et al, 1999), indiquant que SCF/*c-kit* a un rôle crucial dans la transition Aal à A1 dans la spermatogenèse. De plus, SCF/*c-kit* à un rôle important dans la régulation du développement des spermatogonies A1 à A4, puisque ces cellules meurent après l'administration d'un anticorps dirigé contre *c-kit in vivo* (Yoshinaga et al, 1991) et sont protégées par l'addition de SCF dans des tubes séminifères en culture (Yan et al, 2000). Plus précisément, la survie et la prolifération des spermatogonies A est stimulé par l'addition de kit ligand (SCF) *in vitro* (Allard et al, 1996). *In vivo*, kit ligand est produit par les cellules de Sertoli à la fois sous une forme liée à la membrane et sous une forme soluble et se lie à son récepteur *c-kit* exprimé par les spermatogonies A différenciées chez la souris (Manova et al, 1990 ; Yoshinaga et al, 1991).

La voie de signalisation kit ligand apparait donc nécessaire pour le maintien et la prolifération des spermatogonies A différenciées, mais pas pour l'étape d'initiation de la différenciation (Ohta et al, 2000,2003). Cette voie est aussi critique pour la progression et la survie des cellules germinales pendant le stade pachytène de la méiose (Packer et al, 1995 ; Vincent et al, 1998 ; Yan et al, 2000). Enfin, des analyses transcriptomiques sur des spermatogonies issues de testicules traités au kit ligand pendant 24h indiquent que Kit ligand modifie l'expression de



---

gènes connus comme étant stimulés ou inhibés dans les spermatogonies pendant la transition du cycle mitotique au cycle méiotique. Ces informations convergent bien pour un rôle de l'activation de kit par kit ligand pour induire l'entrée en méiose des cellules germinales mâles (Rossi et al, 2008). De par son expression spécifique dans les spermatogonies différenciées, et du fait de son absence dans les spermatogonies différenciées (du moins au niveau protéique), c-kit est considéré comme un marqueur négatif des spermatogonies souches (c-kit<sup>-</sup>). La protéine C-kit étant localisée au niveau de la membrane plasmique de la cellule, son expression permet de faire du tri négatif afin d'enrichir une population en SSCs.

Pourtant la voie c-kit/kit ligand est impliquée dans d'autres systèmes physiologiques en lien avec la biologie des cellules souches. En effet, les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) expriment fortement c-kit qui est ici considéré comme marqueur spécifique du type cellulaire souche et non différencié (Matsui et al, 1990). Au niveau des cellules germinales, la voie c-kit/kit ligand a deux autres rôles bien démontrés chez les mammifères. En effet, Kit est exprimé par les CGPs afin de répondre aux signaux kit ligand émis par les cellules somatiques, pour guider leur migration et stimuler leur prolifération lors du développement embryonnaire (OrrUrtreger et al. 1990, Manova & Bachvarova 1991 ; Matsui et al. 1990, De Felici et al. 1996, Runyan et al. 2006, Gu et al. 2009). De même que pour la migration des CGPs, la voie c-kit/kit ligand est indispensable à la migration des gonocytes de la lumière du tube séminifère à la lame basale ainsi que de stimuler leur prolifération précoce (Orth et al, 1997 ; Ohbo and al, 2003). Avec la transition en spermatogonies des gonocytes, l'expression de kit est nettement réduite. Après avoir identifié les orthologues truite de c-kit et de kit ligand, nous avons analysé leur profil d'expression au sein du testicule au cours du cycle spermatogénétique et dans des fractions testiculaires isolées. Puis nous avons abordé leur régulation par la Fsh *in vitro*.

## Résultats

### - Analyse phylogénétique

Par «tblastn» avec les protéines poisson-zèbre de c-kit et de souris, nous n'avons pour le moment identifié qu'un seul orthologue truite de ce gène (Figure 39). Grâce à une étude phylogénétique plus approfondie, nous observons qu'en réalité tous les autres téléostéens possèdent deux gènes c-kit probablement originaires de la duplication 3R de leur génome. Le c-kit identifié chez la truite correspond au c-kita des autres téléostéens. Le c-kitb a pu être perdu au cours de l'évolution chez la truite. L'autre hypothèse serait qu'actuellement, avec les

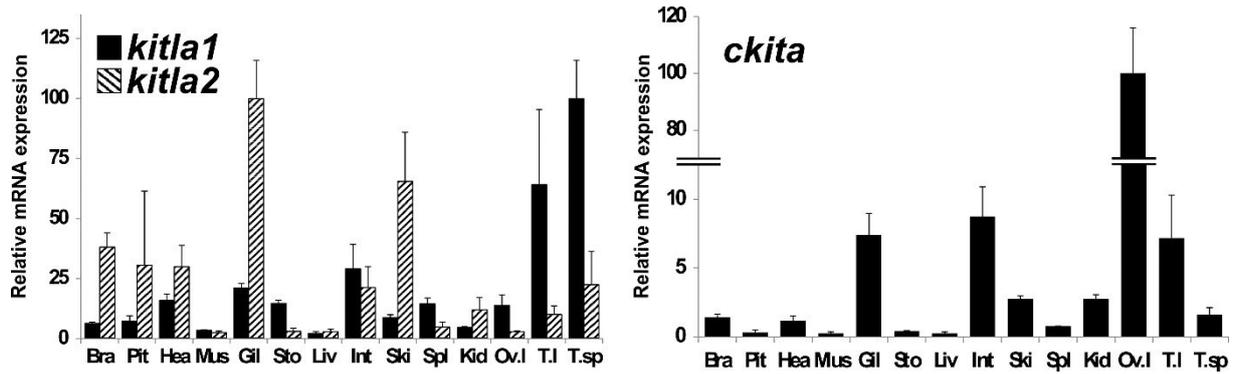


Figure 40 :

Expression tissulaire de *kitla1*, *kitla2* et *ckit* par PCR quantitative.

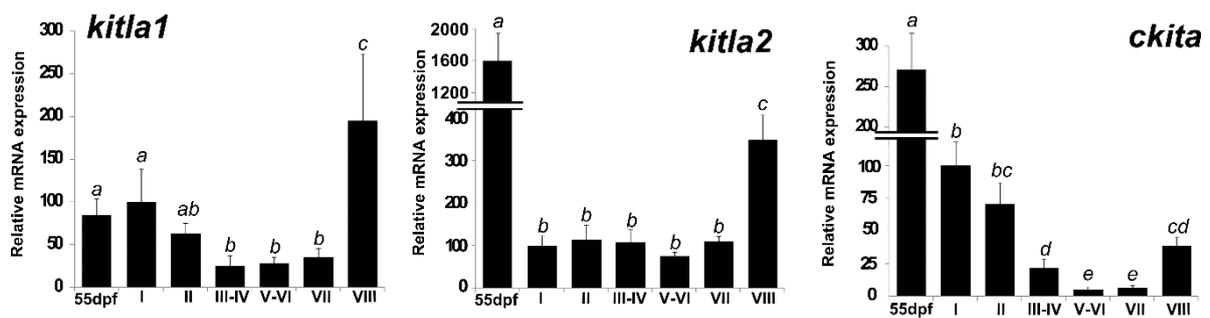


Figure 41 :

Expression au cours du cycle spermatogénétique de *kitla1*, *kitla2* et *ckit* par PCR quantitative.

---

données du génome et nos outils bio-informatiques, nous n'avons pas réussi à l'identifier bien qu'il soit présent. Une recherche est en cours pour approfondir ce point. La même méthode a été utilisée pour identifier les orthologues truite de *kit ligand*. Nous avons à ce jour détecté deux *kit ligand* dans le génome de truite qui semble être tout deux orthologues des *kitla* de téléostéens. Là encore, nos recherches n'ont pour le moment pas permis d'identifier les orthologues de *kitlb*, présent chez les autres poissons téléostéens et probablement originaire de la duplication 3R de leur génome. Les deux *kit ligand* identifiés de truite, *kila1* et *kitla2* sont aussi présents dans le génome du saumon, semblant donc indiquer qu'ils sont issus de la duplication récente du génome des salmonidés, la 4R.

- Expression tissulaire

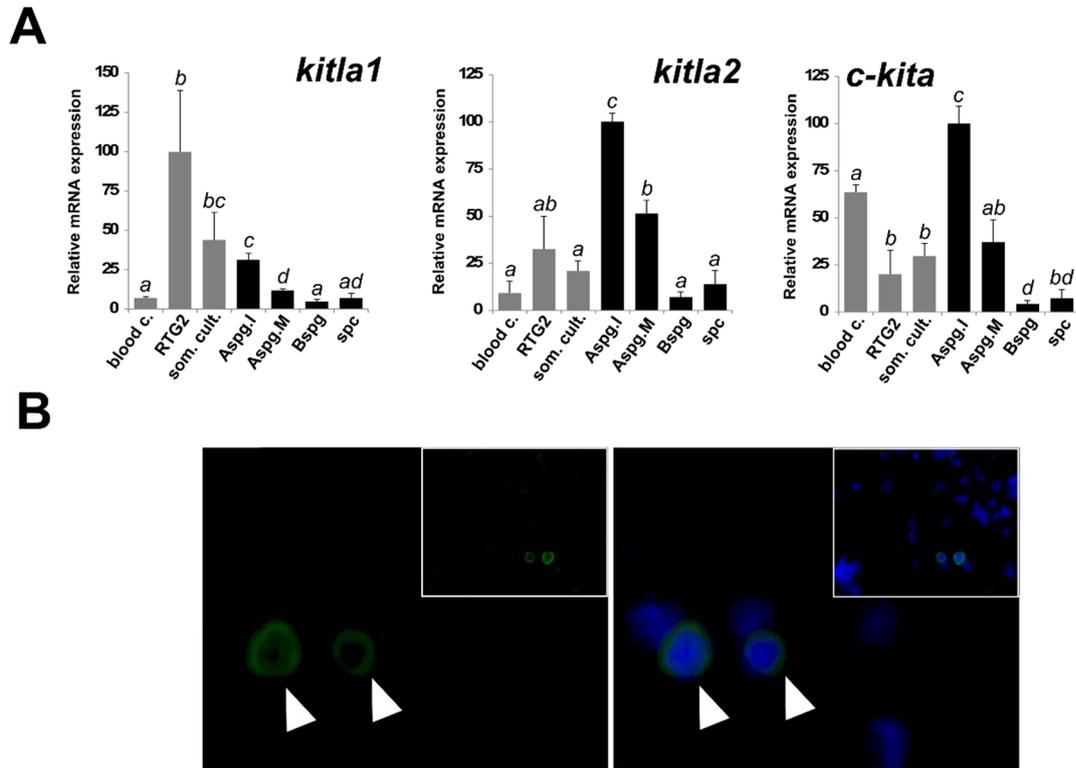
Par PCR quantitative, nous observons que les trois gènes sont exprimés dans de nombreux tissus (Figure 40). Il est intéressant de noter que les taux les plus élevés d'expression sont détectés dans les gonades (ovaire et/ou testicule suivant le gène).

- Expression au cours du cycle spermatogénétique

Les deux *kit ligand* sont fortement exprimés en fin de cycle dans le testicule spermiant (Figure 41). De plus, *kit liganda2* est très fortement exprimé dans le testicule issu d'embryon de 55 jours. L'embryon de 55 jours dépend encore de sa réserve vitelline et termine son développement. En parallèle, *c-kita* est très fortement exprimé chez l'embryon. Dans le testicule immature d'animaux d'un an, l'expression de *c-kita* a diminué par rapport à l'expression embryonnaire (-2.5 x). Avec l'entrée en puberté (stade II), cette expression décroît encore plus jusqu'au stade VII puis remonte chez l'individu spermiant.

- Expression dans les fractions de cellules testiculaires

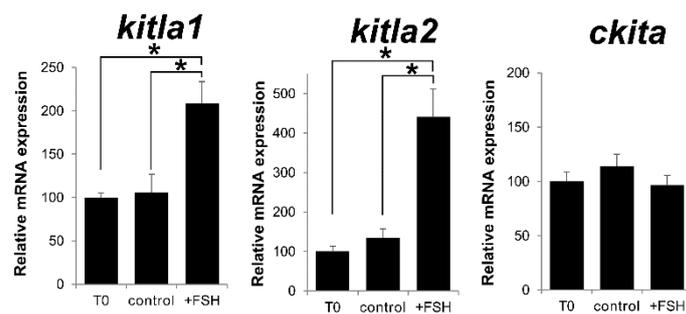
Afin de préciser la location cellulaire de l'expression des gènes, nous avons analysé leur profil d'expression dans des fractions de cellules testiculaires (Figure 42). D'un part, nous avons obtenu plusieurs fractions de cellules somatiques (en gris). Au sein du testicule, nous avons récolté les cellules sanguines et des fractions enrichies en cellules somatiques en culture. Nous avons aussi extrait les ARNs contenus par des cellules RTG2, une lignée de cellules gonadiques de truite. D'autre part, nous avons récolté des fractions de cellules germinales enrichies en différents types (en noir). Ces cellules sont obtenues à partir de cellules testiculaires d'animaux matures et immatures grâce à la technique d'élutriation centrifuge qui permet de trier les cellules selon leur taille et leur masse. Cette technique permet entre autres d'obtenir des fractions enrichies en spermatogonies A, les cellules germinales les plus volumineuses.



**Figure 42 :**

A. Expression dans des fractions de cellules testiculaires de *kila1*, *kitla2* et *c-kit*.

B. Détection de C-kit au niveau de la membrane plasmique de certaines cellules germinales par immunocytochimie dans une fraction de cellules de testicules immature.



**Figure 43 :**

Effet du traitement de Fsh pendant 96h en culture d'explants testiculaire sur l'expression de *kitla1*, *kitla2* et *ckit*

---

C-kit est préférentiellement exprimé dans les fractions de spermatogonies mais il est aussi détecté à un plus faible niveau dans les fractions de cellules somatiques. Les deux kit ligand ont des profils d'expression très différents. Tandis que *kit ligand a1* est très fortement exprimé dans les cellules RTG2, des cellules somatiques, *kitla2* est lui préférentiellement exprimé dans les fractions de spermatogonies A.

Par immunocytochimie avec un anticorps hétérologue, nous observons l'expression de *c-kit* au niveau de la membrane de certaines cellules germinales au sein d'une fraction de cellules testiculaires cytopinées. Aucun signal n'a pu être confirmé avec un autre anticorps testé en cytométrie de flux sur une fraction de spermatogonies A de testicule immature.

- Effet de la Fsh *in vitro*

Comme pour les gènes *gdnf* et *gfra1*, nous avons testé l'impact d'un traitement de Fsh *in vitro* sur des explants de testicule immature (Figure 43). Après 96 h de traitement, l'expression de *c-kit* n'a pas varié, ni dans les puits contrôles ni dans les puits traités avec la Fsh. En revanche, l'expression des deux kit ligands est fortement stimulée après ce traitement Fsh, d'un facteur 2 pour *kitla1* et 4 pour *kitla2*.

## Discussion

Nous montrons ici l'expression de *c-kit* dans de nombreux tissus, dont les spermatogonies et les cellules sanguines. L'expression ubiquitaire de *c-kit* n'est pas surprenante puisque ce gène a été découvert dans des souris mutantes au locus *W*, qui induit un défaut d'expression de ce récepteur, et provoquant des défauts dans l'hématopoïèse, la mélanogenèse et la gamétogenèse (Chabot et al, 1988). Plus précisément au sein des cellules germinales, nous détectons l'expression de *c-kita* restreinte à une population de spermatogonies A enrichies à partir de testicules immature et mature. De plus, nous avons confirmé l'expression de la protéine au niveau de la membrane de certaines spermatogonies A de testicule immature. Chez les rongeurs, la protéine C-KIT est spécifique des spermatogonies A différenciées (A1 à A intermédiaire) (Yoshinaga et al, 1991) mais le transcrit est déjà détecté à faibles niveaux dans la population de spermatogonies A indifférenciées (Manova et al, 1990). L'absence d'expression de la protéine *c-kit* par les spermatogonies souches en fait un marqueur utilisé couramment en tri négatif. En utilisant un deuxième anticorps hétérologue dirigé contre la protéine souris, nous n'avons observé aucun signal en cytométrie en flux sur une population isolée de cellules testiculaires d'animal immature. Ce résultat ne révèle probablement pas la réalité biologique, *i.e.* l'absence



---

d'expression de la protéine c-Kit au niveau membranaire des cellules, mais est plutôt le reflet d'un épitope trop divergent entre la protéine truite et la protéine mammalienne.

De plus, nous avons aussi procédé à l'analyse des profils d'expression de *kit ligand*. Deux gènes *kit ligand* sont présents chez les téléostéens et sont probablement issus de la duplication spécifique 3R des génomes téléostéens (Yao an Ge, 2010). Actuellement, nous avons réussi à identifier deux *kit ligands* dans le génome de la truite, tous deux orthologues de *kit liganda* décrit chez le poisson zèbre. L'expression au niveau transcriptionnel des deux gènes est détectée dans de nombreux tissus en accord avec l'expression ubiquitaire décrite précédemment pour le récepteur, *c-kit*. Il est surprenant de noter que les deux *kit liganda* ont des profils d'expression très divergents dans le testicule alors qu'ils sont probablement issus de la duplication spécifique récente des salmonidés, duplication qui a apporté très peu de spécifications d'expression de gènes. Tandis que nous détectons l'expression de *kitla1* dans les cellules somatiques (culture de cellules somatiques et lignée cellulaire RTG2), *kitla2* est lui plus exprimé dans les fractions de cellules germinales enrichies en spermatogonies. Chez la souris, KIT ligand est sécrété par les cellules de Sertoli seulement. De ce fait, *kit liganda1* est le gène le plus probable d'avoir le même rôle que son orthologue mammalien pour stimuler la différenciation des spermatogonies (Rossi et al, 2000).

Il est intéressant de remarquer que tandis que l'expression de *gdnf* est stimulée du stade V au stade VII (article 2), les *kit ligands* ont une expression stimulée plus tard lors de la spermiation (stade VIII). Ce stade correspond à l'arrêt de la spermatogenèse puisque tous les efforts sont concentrés sur l'excrétion du sperme. Le testicule est alors sujet à de fortes modifications morphologiques dans le but d'excréter le sperme, d'éliminer les cellules différenciées résiduelles et de reconstruire un testicule prêt pour un démarrer un nouveau cycle spermatogénétique. Quelques rares spermatogonies indifférenciées, considérées comme des spermatogonies souches, sont observables sur le bord des tubules du testicule spermiant. À première vue, une expression forte de *kit ligand* à ce stade n'est pas cohérent avec un rôle dans la stimulation de la différenciation et de la prolifération des spermatogonies puisque les quelques spermatogonies détectées sont faiblement prolifératives pendant la période de spermiation, qui dure de 3 à 6 mois. Mais nous pouvons émettre l'hypothèse que la voie *c-kit/kit ligand* aurait un autre rôle que la prolifération des spermatogonies au sein du testicule de truite. En effet, cette voie est impliquée dans d'autres mécanismes chez les mammifères. De plus, la forte expression détectée par PCR quantitative reflète l'accumulation en ARNm, mais



---

la protéine pourrait être traduite plus tard notamment au commencement du prochain cycle spermatogénétique.

L'expression de *c-kit* ainsi que de *kit ligand a2* est la plus forte dans le testicule au stade embryonnaire (55 jpf). La colonisation de la gonade par les CGPs a lieu au moment de l'éclosion, autour de 30 jpf chez la truite arc-en-ciel. Les premières méioses femelles sont détectées vers 55 jpf tandis que chez le mâle la méiose n'a lieu que bien plus tard après l'entrée en puberté. Enfin, une étude décrit un pic de prolifération des cellules germinales présentes dans le testicule de truite autour de 45 jpf (Lebrun and al, 1982 ; Nagler and al, 2011). Cette prolifération précoce pourrait être l'analogue de la prolifération précoce des gonocytes chez les mammifères qui est stimulée par la voie c-kit/kit ligand. Ces données mises en relation avec nos résultats pourraient donc être le reflet d'une stimulation précoce des cellules germinales par la voie c-kit/kit ligand dans le testicule de truite. Enfin, au cours de notre étude nous observons que l'expression des deux *kit ligands* est régulée par Fsh tandis que le récepteur *c-kit* n'est pas affecté. Ces résultats sont cohérents avec les études menées chez certains mammifères (Rossi et al, 1993 ; Thomas et al, 2005). La voie c-kit/kit ligand pourrait donc aussi être impliquée dans la prolifération des spermatogonies induite par Fsh.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont encore préliminaires. Des analyses sont en cours afin d'identifier les autres paralogues de *c-kit* et *kit ligand* au sein du génome de truite. En effet, il est nécessaire de faire une analyse fine de leur profil d'expression pour évaluer leur rôle possible comme acteur de la voie c-kit/kit ligand. De plus, la localisation inattendue de *kitla2* dans les cellules germinales requiert un approfondissement par des techniques d'analyse de la localisation cellulaire du transcrit en hybridation *in situ*. De même, il serait intéressant d'évaluer la proportion de spermatogonies exprimant *c-kit*. En effet, bien que chez la souris *c-kit* est restreint aux cellules spermatogoniales différenciées, des études sur un animal phylogénétiquement éloigné, la roussette montre une expression de l'orthologue de *c-kit* beaucoup moins restreinte avec une expression détectée dans les spermatogonies A indifférenciées jusque dans les spermatoctes (Bosseboeuf et al., 2013). Enfin, l'expression embryonnaire forte de *c-kit* et *kila2* suggère leur implication dans un processus de prolifération analogue à la prolifération précoce des gonocytes chez les mammifères. Ces données sont très prometteuses et représenteraient la première description d'un tel phénomène chez un téléostéen. Une étude approfondie du profil précoce d'expression de *c-kit* et de *kitla2* couplée à une analyse de la prolifération des cellules germinales testiculaires seront nécessaires pour confirmer ce point.



---

### III – Conclusions du volet 2

Grâce à des analyses phylogénétiques approfondies couplées à l'étude du profil d'expression des gènes au cours de la spermatogenèse, nous montrons la conservation d'expression testiculaire des homologues truites de *gdnf* et *kit* ligand. Ces deux facteurs sécrétés par les cellules somatiques testiculaires sont impliqués dans le contrôle de la prolifération des spermatogonies chez les mammifères. En particulier, plusieurs études montrent le rôle indispensable de *gdnf* pour la régulation de l'auto-renouvellement et le maintien des SSCs *in vivo* et *in vitro*. A l'opposé, *kit* ligand est impliqué chez l'adulte pour stimuler la différenciation et la prolifération des spermatogonies A différenciées.

Outre l'expression du facteur *gdnf* au sein du testicule de truite, nous détectons aussi l'expression forte et restreinte de son récepteur, *gfra1*, dans les fractions de spermatogonies indifférenciées isolées de testicules immature et mature. Plus précisément, nous confirmons l'expression de la protéine au niveau de la membrane d'une sous-population de spermatogonies A (10-15%), proposées comme étant les SSCs. L'expression à la fois du facteur *gdnf*, ainsi que de son récepteur *gfra1* (dans une sous-population de spermatogonies indifférenciées) supportent un rôle conservé de la voie *gdnf/gfra1* dans la régulation du devenir des SSCs. De plus, l'expression forte de *gdnf* en fin de cycle spermatogénétique, période où la prolifération et la différenciation des spermatogonies s'arrêtent, nous permet de proposer un rôle de la voie *gdnf* pour maintenir l'état indifférencié des SSCs et non sur la stimulation de leur prolifération.

C-kit, le récepteur de *kit* ligand, est détecté au sein du testicule dans les fractions de spermatogonies A isolées de testicule immature et mature. Nous n'avons à ce jour pas d'information de localisation spécifique qui pourrait montrer que l'expression de *c-kit* est restreinte au sein de la population de spermatogonies. En effet, chez les mammifères C-KIT est exprimé spécifiquement par les spermatogonies différenciées. Au vu de nos résultats, nous ne pouvons pas à ce jour établir les mêmes conclusions. Mais nous pouvons toutefois affirmer que la voie *c-kit* et *kit* ligand est régulée au cours du cycle testiculaire, probablement en lien avec son rôle dans la gonade qui pourrait jouer sur la régulation du devenir des spermatogonies.

Enfin, grâce à l'analyse des effets induits suite à un traitement Fsh prolongé en culture d'explants testiculaires, nous montrons que Fsh stimule à la fois l'expression de *gfra1* et des *kit* ligands mais qu'elle empêche directement ou indirectement l'expression de *gdnfb*, qui normalement croît avec le temps de culture. Nous confirmons aussi que Fsh est fortement impliquée dans la prolifération des spermatogonies. La stimulation de la prolifération des



---

spermatogonies par Fsh pourrait donc être liée à sa régulation sur la voie gdnf/gfra1 et/ou sur la voie c-kit/kit ligand.



---

# **DISCUSSION**



---

Dans un premier temps, mon travail de thèse avait pour but d'identifier au plus près les cellules spermatogoniales souches au niveau morphologique, moléculaire et fonctionnel chez la truite arc-en-ciel. La deuxième partie de mon travail fut d'élucider les mécanismes qui régulent leur devenir via des signaux intrinsèques, paracrines et périphériques.

## **1. La truite arc-en-ciel, un modèle de choix pour étudier les spermatogonies souches chez un vertébré non-mammalien**

L'utilisation de la truite arc-en-ciel comme animal modèle pour l'identification des spermatogonies souches chez les poissons s'est avéré un choix judicieux. En effet, la truite arc-en-ciel est avant tout un animal de fort intérêt agronomique. Une étude directe sur sa physiologie permet d'apporter des réponses ou de nouvelles connaissances sur son fonctionnement biologique notamment du point de vue de la reproduction, de la croissance du muscle, et du stress, trois aspects d'intérêt pour l'élevage. Des études menées sur des poissons de laboratoire tels que le poisson-zèbre ou le médaka, ne sont pas toujours transposables au modèle truite.

Contrairement au poisson-zèbre qui est hermaphrodite juvénile, la truite est un animal avec un sexe de type hétérogamétique XY. Grâce à des traitements oestrogéniques précoces, il est possible d'obtenir une population de femelle génétiquement XY. La fécondation d'œufs obtenus à partir des néo-femelles XY permet d'avoir 25% de descendants YY. Ces mâles YY produisent des gamètes fertiles qui sont ensuite utilisés pour féconder des œufs de femelle normale XX afin d'obtenir des populations pures de descendants mâles XY normaux, les monosexes mâles (Chevassus et al., 1988). Ce moyen d'obtenir des populations exclusivement mâles est un avantage certain lorsque l'on travaille sur le système reproducteur mâle sachant que les truites immatures ne présentent aucun phénotype sexuel externe.

La truite est un gros poisson (œuf de 4 mm, et adulte de 30 à 40 cm) avec un développement long (éclosion à 30 jours). La taille des embryons à l'éclosion ainsi que leur développement long nous ont permis de faire des expériences de transplantations avec une importante quantité de cellules (dont des SSCs) et microinjectée dans la cavité péritonéale d'un embryon. Les embryons de poisson-zèbre beaucoup plus petits, éclosent en 48h et ceux de médaka en 9 jours, ne permettant donc pas de telles manipulations et en grandes quantités.

La taille importante de l'animal permet aussi de disposer d'une abondante quantité de tissus, et notamment de tissus gonadiques. Dans le cadre de l'étude de la spermatogenèse, cela permet



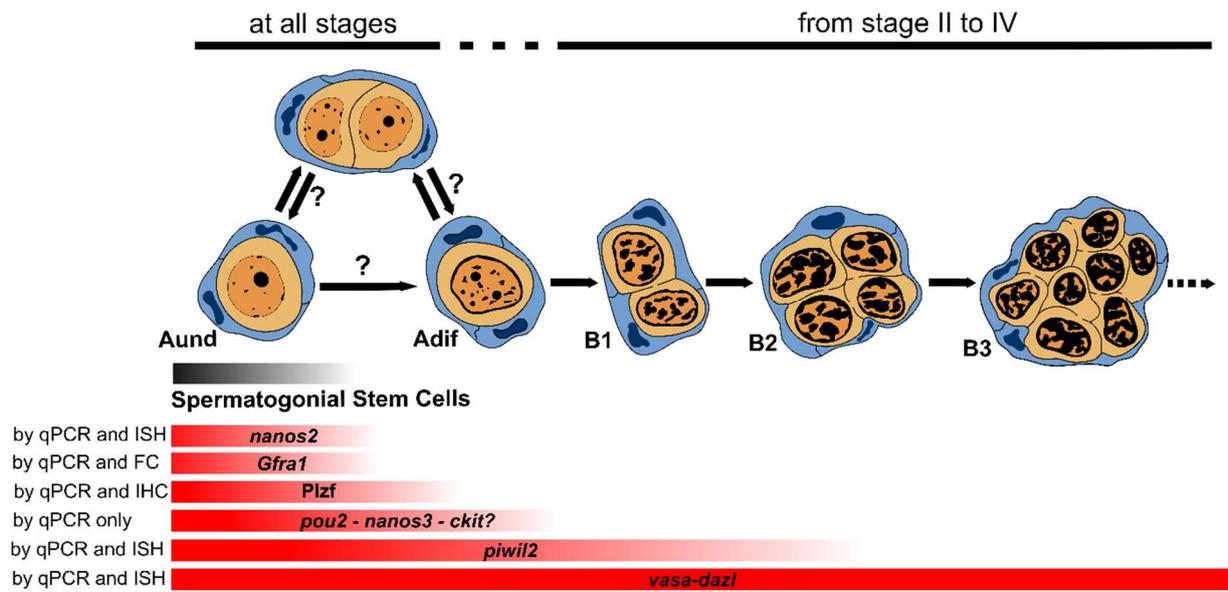
---

de mettre en culture des morceaux de gonades (explants) pour des études *in vitro* ou encore d'avoir accès à un nombre abondant de cellules germinales, permettant donc une purification poussée de ces cellules (élutriation). L'élutriation centrifuge qui trie les cellules selon leur taille, permet d'obtenir des fractions enrichies en différents types de cellules germinales. Nous avons donc obtenu des fractions enrichies en cellules post-méiotiques (spermatides et spermatozoïdes), en spermatocytes, en spermatogonies B et surtout en spermatogonies A, les plus grosses cellules germinales.

Enfin, l'aspect biologique le plus déterminant pour utiliser la truite dans le cas de l'étude des cellules spermatogoniales souches tient à sa reproduction fortement saisonnée. En effet, le cycle spermatogénétique de la truite consiste en une succession de stades définis par la proportion et la nature des cellules germinales différenciées observées dans la gonade. La succession progressive et saisonnée des stades de la spermatogenèse, permet d'étudier les mécanismes de régulation impliqués dans chaque étape de la formation des cellules germinales. Cette spermatogenèse cyclique nous permet donc d'avoir accès à des étapes clés de la biologie des SSCs, de l'engagement en auto-renouvellement ou en différenciation : la prolifération lente des spermatogonies chez l'immature (stade I), la prolifération active des spermatogonies (stades II-III) et la « quiescence » des SSCs avant la reprise du prochain cycle spermatogénétique (stade VIII). Lors de notre étude, les autres stades se sont aussi avérés intéressants. Notamment, les stades IV-V qui contiennent tous les types de cellules germinales, nous ont permis d'analyser *in situ* la localisation de l'expression des gènes d'intérêts sélectionnés et d'apprécier leur restriction à un type germinal donné.

Toutefois, l'utilisation de la truite arc-en-ciel s'est avérée limitante et contraignante sur certains points. Si le modèle est favorable aux transplantations chez l'embryon en grand nombre, la maturité tardive et donc la production de spermatozoïdes matures n'a lieu au plus tôt que un an à deux ans après la transplantation, chez des animaux de 0,5 à 2 kg, ce qui rend les tests sur la progéniture très longs et coûteux. Cependant, cette contrainte a été limitée par le fait que l'utilisation de la PCR sur les gonades d'individus receveurs quatre à cinq mois après transplantation nous a permis d'estimer l'aptitude des cellules donneuses à coloniser la gonade avec autant de succès que le test sur la progéniture.

Enfin, à la base des téléostéens on trouve une duplication globale du génome (3R) (Ohno et al., 1968) et les salmonidés dont fait partie la truite ont subi une duplication surnuméraire de leur génome, la 4R (Allendorf and Utter, 1976). Cela peut représenter un handicap certain pour les études moléculaires puisque de ce fait, pour un gène chez la souris, il y a potentiellement quatre



**Figure 44 : Expression des homologues de marqueurs de SSCs mammaliens dans la population de spermatogonies A indifférenciées du testicule de truite**

---

gènes homologues chez la truite (et deux chez les autres téléostéens). Avec le récent séquençage du génome de truite (projet Genotrouit français et projet de l'USDA canadien) et celui du saumon (cGRASP), nous avons pu rechercher exhaustivement les paralogues spécifiques aux salmonidés et ceux issus de la duplication des téléostéens. Dans notre étude, des paralogues issus de la duplication spécifique des salmonidés ne sont, soit pas exprimés (*gdnfa1* et *gdnfa2* ; *gfra1b*), soit présentent les mêmes profils d'expression (*plzfa* et *plzfb* ; *pou2a* et *pou2b*) dans le testicule au moins. Leur apparition n'a donc apporté que peu ou pas de spécification d'expression.

## **2. Des marqueurs de SSCs mammaliens exprimés dans des sous-populations de spermatogonies indifférenciées (figure 44)**

Après avoir listé les marqueurs (intracellulaire et membranaire) de spermatogonies indifférenciées/souches cités dans la littérature mammalienne principalement, nous avons procédé à leur recherche dans les séquences de transcrits (SIGENAE) et dans le génome de truite. Quatre facteurs de transcription connus pour leur expression et/ou rôle dans les SSCs chez d'autres espèces ont été particulièrement étudiés au cours de ma thèse : *pou2*, *plzf*, *nanos2* et *nanos3*.

En particulier, *pou2* (*a* et *b*), homologue de *Pou5f1* mammalien (*oct4*) et *nanos3* sont exprimés préférentiellement dans les fractions de spermatogonies A enrichies de testicule de truite (immature et mature) ainsi que l'expression la plus forte en début de cycle spermatogénétique. Ces deux résultats suggèrent donc que *pou2* et *nanos3* peuvent être considérés comme marqueurs de spermatogonies indifférenciées. La localisation des transcrits *in situ* n'a pas permis d'affiner la localisation cellulaire de ces deux gènes au sein de la population de spermatogonies A. L'absence de signal détecté par HIS est probablement dû à la faible expression absolue détectée par PCR quantitative des transcrits dans les stades spermatogénétiques. Il serait envisageable de tenter à nouveau l'expérience en utilisant une méthode d'amplification du signal.

PLZF est un marqueur de toutes les spermatogonies indifférenciées (As à Aal) chez la souris (Costoya et al., 2004).. Dans notre étude, les orthologues truite de *plzf*, *plzfa* et *plzfb* sont préférentiellement exprimés dans les fractions de spermatogonies A. Ce profil d'expression a été ensuite affiné par immunohistochimie en utilisant un anticorps hétérologue dirigé contre un épitope conservé entre la protéine truite prédite et la protéine souris. Nous détectons un signal



---

dans certaines spermatogonies A chez l'immature et le stade IV et dans toute les spermatogonies A résiduelles chez le spermiant. Ces résultats iraient donc dans le sens que Plzf (transcrit et protéine) est exprimé par les spermatogonies A les moins différenciées dont les souches. Il est aussi intéressant de remarquer que Plzf est détecté dans certaines cellules somatiques du testicule spermiant. Plzf est connu pour être impliqué dans d'autres types de cellules souches au sein de l'organisme (Reid et al., 1995). À l'issue d'un cycle spermatogénétique, les spermatogonies ainsi que les cellules de Sertoli et probablement les cellules périvitubulaires ont besoin de constituer un nouveau stock de cellule pour assurer le cycle spermatogénétique suivant. Il a été montré chez les poissons que le nombre de cellules de Sertoli n'est pas fixe à la naissance comme chez les mammifères mais que ces cellules prolifèrent et meurent au cours du cycle testiculaire (Orth et al., 1988; Schulz et al., 2010). La présence de plzf dans des cellules somatiques chez les spermiant pourrait donc indiquer un rôle de ce gène dans des cellules souches testiculaires autres que les SSCs.

Un autre résultat intéressant quant au rôle de Plzf a pu être mis en évidence via les expériences d'immunohistochimie. En effet, le signal de Plzf est majoritairement détecté dans le cytoplasme des spermatogonies dans le testicule immature, dans le cytoplasme et/ou dans le noyau des spermatogonies du testicule stade IV (milieu de spermatogenèse) et dans le noyau des spermatogonies chez le spermiant. Plzf est un facteur de transcription qui réprime l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des spermatogonies tels que TORC1 ou C-KIT (Filipponi et al., 2007). Son activité a donc lieu dans le noyau. Sa localisation dans le cytoplasme serait due à une régulation post-traductionnelle telle que l'ubiquitination, qui ségrégerait la protéine dans le cytoplasme et l'entraînerait dans la voie de dégradation. L'expression de Plzf dans le cytoplasme a été rarement décrite (Allemand I, données non publiées). Cette localisation dans le cytoplasme chez l'immature induirait donc la levée de la répression de différenciation des spermatogonies par Plzf tandis que chez le spermiant, l'expression dans le noyau serait reliée à la répression de la différenciation des SSCs.

Enfin, *nanos2*, un autre gène de la famille *nanos* a une expression décrite dans les spermatogonies souches chez la souris (Sada et al., 2009; Suzuki et al., 2007; Tsuda et al., 2003). L'orthologue truite est exprimé préférentiellement dans les spermatogonies A et plus précisément dans moins de 20% de la population de spermatogonies contenues dans le testicule immature (par HIS) mais est présent dans toutes les spermatogonies A résiduelles du testicule « spermiant ». Il est aussi intéressant de noter que *nanos2* identifie des spermatogonies A isolées et en doublet. Ces informations nous ont amené à proposer *nanos2* comme un marqueur



---

de sous-populations de spermatogonies A indifférenciées, et plusieurs arguments supportent l'idée que cette sous population correspond aux spermatogonies souches. Premièrement, l'expression de *nanos2* dans toutes les spermatogonies inactives au stade spermiant et dans les gonocytes à 64 jours relie cette expression au caractère souche. Deuxièmement, il a été montré que chez le médaka, *Nanos2* est exprimé spécifiquement dans les ovogonies souches (Nakamura et al., 2010). Troisièmement, *nanos2* est un marqueur des spermatogonies les plus indifférenciées (As et Apr) chez les rongeurs (Sada et al., 2009; Suzuki et al., 2007; Tsuda et al., 2003). Pourtant, nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité que *nanos2* identifie non pas les spermatogonies les plus « souches » mais plutôt une étape ultérieure de spermatogonies A progénitrices. De plus, il a été récemment montré que la protéine *Nanos2* a une expression un peu plus large dans les spermatogonies de tilapia puisqu'elle est exprimée jusque dans les cystes de 8 spermatogonies. En perspective, pour vérifier ces hypothèses, ainsi que pour les autres marqueurs proposés (*plzf*, *pou2* et *nanos3*), il serait intéressant de coupler l'analyse du profil d'expression des gènes avec l'analyse de la prolifération des cellules par la technique de pulse-chasse au BrdU par exemple. Si le marquage *nanos2* est observé dans des cellules faiblement prolifératives qui retiennent le marquage par le BrdU (« label retaining cells »), on pourra confirmer notre hypothèse de *nanos2* comme marqueur de spermatogonies souches chez la truite arc-en-ciel.

Au vu des données de la littérature, la famille *nanos* semble être un acteur clé au sein des cellules germinales souches chez des espèces phylogénétiquement distantes telles que la drosophile, la souris et le médaka (Nakamura et al., 2010; Sada et al., 2009; Wang and Lin, 2004). L'identification des orthologues truite de *nanos2* et *nanos3* nous a conduits à mener une analyse phylogénétique approfondie sur les gènes de la famille *nanos*. En effet, bien que des études ont déjà été menées afin de proposer une histoire évolutive des *nanos* en incluant les mammifères et les téléostéens, aucun argument ne permettait de confirmer la même origine ancestrale des *nanos2* téléostéens et mammifères (Aoki et al., 2009; Beer and Draper, 2013). L'identification des gènes *nanos* chez des espèces situées à des points clé de l'évolution des vertébrés nous a permis d'approfondir l'origine des *nanos*. Nous confirmons que *nanos2* et *nanos3* sont issus de la duplication d'un gène ancestral probablement lors des duplications 1R/2R des vertébrés. Grâce à l'analyse synténique couplée à la reconstitution d'un arbre phylogénétique, nous avons des arguments nouveaux montrant que les *nanos2* téléostéens et *nanos2* mammaliens sont originaires du même gène ancestral. Cette conclusion est la même pour *nanos3*. Au vu des données de phylogénie, des données de la littérature et de nos résultats,



---

nous proposons que *nanos2* identifie les spermatogonies souches de truite arc-en-ciel. L'identification de huit gènes *nanos* chez le cœlacanthe mais seulement quatre chez les téléostéens et trois chez les mammifères soutient une évolution complexe de cette famille, qui n'a pas été totalement expliquée à l'issue de nos analyses. La reconstitution de l'histoire évolutive de la famille *nanos* est donc à ce jour imparfaite et nécessite des travaux complémentaires. En perspectives, il faudrait approfondir les analyses synténiques en élargissant la zone de synténie et en incluant d'autres poissons téléostéens notamment la truite arc-en-ciel. De même, il serait nécessaire de reconstruire la séquence protéique complète de tous les gènes *nanos* identifiés afin de pouvoir proposer un arbre phylogénétique retraçant le plus fidèlement l'évolution des *nanos* chez les vertébrés.

Outre les facteurs de transcription qui permettent d'identifier *in situ* les sous-populations de spermatogonies, nous avons procédé à la recherche de marqueurs membranaires qui permettraient l'utilisation d'outils biotechnologiques tels que le FACS ou le MACS. Pour tester la présence de protéines membranaires utiles pour un tri de sous-populations de spermatogonies, nous avons directement procédé à un crible de leur expression par cytométrie en flux via l'utilisation d'anticorps hétérologues mammaliens. Nous n'avons jamais obtenu de signal en testant de nombreux anticorps dirigés contre CD9, ITGA6 (CD49f), SSEA1 et C-KIT (CD117), tous connus soit comme marqueur pour enrichir une population en spermatogonies souches, soit pour faire du tri négatif afin d'éliminer des cellules différenciées (Pain et al., 1996; Kanatsu-Shinohara et al., 2004; Shinohara et al., 1999, Shinohara et al., 2000) En revanche, nous avons obtenu un résultat très intéressant en utilisant un anticorps anti-GFRA1 dirigé contre un épitope fortement conservé entre la protéine truite et la protéine souris. En effet, nous avons détecté de façon répétée une sous-population fortement positive au sein de spermatogonies A purifiées par élutriation. Nous avons tout de même eu des difficultés à avoir une proportion de cellule *Gfra1* positives constantes entre toutes nos expériences. En effet, nous avons obtenus des taux de 4 à 15% de cellules marquées, variabilité peut-être due à l'utilisation d'animaux tous immatures mais d'âges variant de 3 mois à 1 an. La proportion de cellules *Gfra1* positives qui évolue avec la croissance de la gonade, pourrait refléter une évolution de la proportion de SSCs au sein des spermatogonies A indifférenciées. Par PCR quantitative, nous avons aussi confirmé que l'expression du transcrite de *Gfra1* est spécifique aux spermatogonies A et est élevée en début de cycle (stade I-II). Chez les mammifères, *gfra1* identifie une sous-population des spermatogonies indifférenciées (Ebata et al., 2005; Naughton et al., 2006).



---

Récemment, il a été montré que chez le tilapia *Gfra1* est exprimé dans 90% des spermatogonies A indifférenciées isolées, les Aund (Santos Nassif Lacerda et al., 2013). Chez les mammifères alors que les spermatogonies isolées –As– sont considérées comme les vraies souches, 10% de cette population n’exprime pas *GFRA1* (Ebata et al., 2005; Naughton et al., 2006). L’hypothèse faite est que *gfra1* est exprimé par les cellules qui prolifèrent et non par les cellules souches totalement quiescentes, les « potential stem cell ». Enfin, au vue de l’identification d’une sous-population *Gfra1* positive et une sous-population *nanos2* dans les spermatogonies isolées de truite, il serait intéressant de faire une expérience de co-marquage afin de vérifier si ces deux marqueurs identifie les mêmes populations de spermatogonies A indifférenciées.

Suite à l’observation que *Gfra1* identifie une sous-population au cytomètre en flux, nous avons tenté par deux fois un tri en FACS des cellules positives sur une population initiale de 25 et 40 millions de spermatogonies A purifiées par éluatriation. Lors de nos deux expériences, nous n’avons pas pu vérifier l’enrichissement potentiel en spermatogonies souches de cette population en analysant le profil d’expression de *gfra1* et de *nanos2* par qPCR. En effet, aucune différence significative n’a été observée entre le profil d’expression de la fraction triée « positive » et de la fraction triée « négative ». Ces résultats doivent s’expliquer en partie par une liaison faible de *Gfra1* avec l’anticorps hétérologue mammalien ou par un faible nombre de récepteurs par cellules. Chez les modèles mammaliens, *GFRA1* permet de trier une population de cellules positives, mais ces dernières sont faiblement enrichies en spermatogonies souches. En effet, plusieurs équipes ont montré que *GFRA1* ne permettait pas ou peu d’enrichir en spermatogonies souches, en analysant les résultats de transplantations entre fractions négatives pour *GFRA1* et fractions positives pour *GFRA1* (Buageaw et al., 2005; Hofmann et al., 2005). Malgré ces résultats décevants de tri FACS, l’expression de *gfra1* par une sous-population de spermatogonies nous permet de proposer que cette population contient des spermatogonies souches, et que la voie de signalisation *Gfra1/Gdnf* est impliquée dans la régulation de leur devenir au sein du testicule de truite arc-en-ciel.

Enfin, un autre marqueur, ici des spermatogonies différenciées, a été aussi étudié au cours de mon projet de thèse. *C-KIT* est un récepteur membranaire exprimé par les CGPs et les gonocytes pour guider leur migration dans la gonade primordiale ou à la lame basale respectivement, en réponse au kit ligand sécrété par les cellules somatiques environnantes (Gu et al., 2009; Ohbo et al., 2003). Dans le testicule adulte *C-KIT* est exprimé exclusivement par les spermatogonies différenciées, bien qu’au niveau transcriptionnel il soit détecté dans les spermatogonies indifférenciées (Prabhu et al., 2006; Shinohara et al., 2000b). Suite à notre



---

étude, nous n'avons pas obtenu de signal positif lors de tests au cytomètre en flux, avec l'utilisation d'anticorps hétérologues. Pourtant, le transcrit est détecté fortement dans le testicule immature dans les spermatogonies A. Une telle expression concorde avec une implication dans la régulation de la prolifération et/ou survie des spermatogonies chez la truite.

### **3. Des spermatogonies A indifférenciées isolées et en doublet**

La classification proposée par Loir distinguait trois types de spermatogonies A dans le testicule de truite arc-en-ciel; les spermatogonies A1, grosses cellules avec un nucléole visible, et les A2 qui possèdent un à deux nucléoles et présentent un noyau d'aspect plus marbré (Loir, 1999). Il proposait aussi l'existence de spermatogonies A0 souches qui partagent les mêmes caractéristiques morphologiques que les spermatogonies A1. Dès que plus de deux spermatogonies partagent un même cyste, ces spermatogonies sont appelées spermatogonies B différenciées en prolifération rapide. Les cystes ou groupes de 2 cellules sont souvent difficiles à caractériser en microscopie optique (2 cystes très accolés ou un doublet de spermatogonies A issues d'une division ou un cyste de 2 spermatogonies B ?). Grâce à la microscopie électronique, nous avons observé des spermatogonies isolées et en doublet dans des testicules où a lieu la spermatogenèse active (stade IV) ou en fin de cycle (VIII) avec des caractéristiques de spermatogonies indifférenciées décrites chez d'autres espèces de mammifères et de poissons (Chiarini-Garcia and Russell, 2002; Loppion et al., 2008; Leal et al., 2009).

La caractéristique la plus distinctive par rapport aux spermatogonies déjà engagées dans la voie de différenciation est la présence de très peu d'amas d'hétérochromatine dans le noyau. Cette caractéristique est observée dans les spermatogonies souches identifiées de mammifères et de poissons mais aussi dans d'autres types de cellules souches (Ahmed et al., 2009; Francastel et al., 2000). Plusieurs études tendent à montrer que la condensation de la chromatine serait associée à la différenciation de la cellule souche, et serait impliquée dans la répression des gènes inutiles pour la cellule différenciée. L'aspect de la chromatine apparaît donc comme un marqueur morphologique fort de l'état souche d'une cellule. Il est intéressant de noter la présence de moins en moins d'hétérochromatine dans les spermatogonies indifférenciées avec l'avancement de la spermatogenèse. Les spermatogonies du stade « spermiant » étant celles qui présentent le moins d'amas de chromatine dans leur noyau. Ces cellules sont considérées comme les cellules souches inactives du testicule adulte, sont faiblement prolifératives voire



---

quiescentes lors de la période entre deux cycles qui dure 4 mois environ. La faible présence de chromatine traduirait donc leur état quiescent et indifférencié.

L'aspect des spermatogonies A immatures observées est homogène avec des amas d'hétérochromatine visibles (plus que les spermatogonies A de stade V et VIII) et un à trois nucléoles bien noirs dans le noyau tandis qu'aucun doublets n'a été observé. Pourtant, le marquage hétérogène de *nanos2* dans à peine 20% des spermatogonies A chez l'immature nous fait supposer une diversité d'état des spermatogonies A. De plus, en microscopie optique, nous détectons des spermatogonies A avec des aspects du noyau différent dans le testicule immature. Or, ces différences n'ont pas été clairement décelées en MET peut-être du fait d'un trop faible nombre de gonades examinées. Enfin, la gonade ne cesse de croître chez l'immature. Tandis qu'une cinquantaine de CGPs sont détectées dans la gonade d'un embryon de 30 jours (~1 cm), la gonade pré-pubère s'est accrue d'un facteur 1500 en poids, le rapport gonado-somatique restant stable jusqu'à la puberté ce qui suppose une prolifération très régulière des SSCs/progénitrices. Chez l'immature, nous observons des mitoses ponctuelles traduisant cette prolifération. Que nous n'ayons pas observé de doublet issu de la prolifération des spermatogonies A indifférenciées chez l'immature traduit sans doute un phénomène rare, et difficilement observable. En MET, au stade IV, nous avons clairement distingué des cystes de deux spermatogonies différenciées et des doublets de spermatogonies indifférenciées voire souches. Les doublets de spermatogonies différenciées ou en différenciation sont liés par des ponts inter-cytoplasmiques chez la truite (spermatogonies « B ») mais aussi chez les autres espèces de vertébrés et considérés comme une caractéristique qui détermine le statut souche versus le statut progéniteur d'une cellule (Huckins and Oakberg, 1978 ; Loppion et al., 2008) Les doublets de cellules indifférenciées identifiés ici ne présentaient pas de ponts inter-cytoplasmiques connectant les deux cellules mais des jonctions spécialisées entre les membranes. L'aspect morphologique entre les deux cellules est sensiblement le même avec un ou deux nucléoles, peu d'hétérochromatine et les mêmes organites cytoplasmiques (nombreuses mitochondries et des granules germinaux). Rien n'a permis donc de déceler de potentielles divisions asymétriques.

Au sein des cellules indifférenciées identifiées à chacun des stades (stade I, IV, VIII), on observe des organites caractéristiques : de nombreuses mitochondries rondes et des granules germinaux. Les granules germinaux sont une structure spécifique des cellules germinales et sont concentrés en protéines et ARNm dont *vasa*, *dazl*, *piwi* et *nanos* (Kotaja and Sassone-Corsi, 2007; Aravin et al., 2009; Chuma et al., 2003) . Le rôle de ces structures serait de stocker



---

des ARNm et/ou de réprimer l'expression de certains ARNm. Le plasma germinal est présent dans les spermatogonies sous forme de nuage ou de ciment lorsqu'il est associé à des mitochondries. Il évolue en corps chromatinien dans les gamètes matures. Dans notre étude, *piwil2* est détecté dans toutes les spermatogonies A chez l'immature, et dans les spermatogonies A et les cystes jusque 4 spermatogonies B au stade IV. Ce gène est connu dans les autres espèces pour jouer un rôle dans le maintien de l'état indifférencié des spermatogonies via son rôle dans le nuage germinal (Brennecke et al., 2007; Carmell et al., 2007; Gunawardane et al., 2007). Son profil d'expression dans les spermatogonies A et les petits cystes pourraient donc correspondre à un rôle conservé de ce gène. De plus, au vu de son profil plus restreint que *vasa* dans les populations de spermatogonies A, *piwil2* apparaît comme un marqueur intéressant des spermatogonies A pour d'éventuelles études de co-marquage afin d'évaluer la différenciation.

Nous avons montré que *nanos2* est exprimé par une sous-population des spermatogonies isolées ou en doublet, proposées comme étant les spermatogonies souches. Ces résultats sont parallèles à l'observation en MET de spermatogonies isolées et en doublet avec des caractéristiques morphologiques de spermatogonies souches. On souhaiterait confirmer que les cellules identifiées en MET comme « souches » sont *nanos2* positives. Pour cela, un protocole d'hybridation *in situ* en MET pour *nanos2* est envisageable. L'hybridation *in situ* favorise le maintien des ARNs au détriment du maintien de la morphologie. Dans une première tentative nous avons utilisé un nouveau système de fixation et d'inclusion favorable à l'HIS. Cependant, du point de vue morphologique, le tissu et les cellules furent totalement déstructurés, et le marquage aspécifique des billes d'or beaucoup trop intense. Cette approche nécessitera d'importantes mises au point.

#### **4. Des fractions de spermatogonies avec un potentiel élevé de colonisation de la gonade après transplantation**

Le test fonctionnel qui permet d'identifier une population de spermatogonies souches le moins équivoque est la transplantation. Ce test permet de vérifier trois propriétés des cellules souches : le recrutement par la niche germinale (migration, colonisation), la prolifération (auto-renouvellement), et la participation à la spermatogenèse du receveur (différenciation). Au cours de ma thèse, nous avons utilisé le protocole de transplantation mis au point par l'équipe de Yoshizaki (Okutsu et al., 2006). Les cellules testiculaires isolées d'un animal donneur sont transplantées directement dans la cavité péritonéale d'un embryon receveur au moment de la



---

migration endogène des CGPs (vers 30 jpf). Contrairement à son équipe, nous ne disposons pas dans notre laboratoire d'une lignée transgénique exprimant spécifiquement la GFP dans les cellules germinales, qui nous permettrait donc de suivre *in situ* grâce à la fluorescence, le trajet, la prolifération et la différenciation des cellules transplantées dans la gonade du receveur. À court terme, nous avons souhaité vérifier la colonisation de la gonade par les cellules transplantées. Pour ce faire, les cellules étaient préalablement marquées avec un colorant fluorescent de la membrane, le PKH26. Plusieurs équipes travaillant sur des modèles poissons entre autres, ont utilisé avec succès ce marquage pour suivre la colonisation des gonades (Lacerda et al., 2008 ; Majhi et al., 2009). Avec la prolifération des cellules, le marquage est dilué et n'est plus détectable 6 semaines après la transplantation. Dans notre étude, nous n'avons que très partiellement pu utiliser cette approche, notamment du fait de la difficulté de manipulation des truitelles de 60 jpf et de l'autofluorescence des cellules de la cavité abdominale. Nous avons préféré à cette technique l'utilisation comme source de cellules testiculaires, une lignée transgénique de truite *mhc2::GFP* où la GFP s'exprime dans le muscle, lignée mise au point par nos collègues Rescan et Gabillard au laboratoire (Gabillard et al., 2010). Les cellules testiculaires ne sont donc pas fluorescentes mais présentent le transgène exogène au sein de leur génome. Deux techniques nous ont permis d'évaluer le succès de transplantation : à moyen terme, 5 à 6 mois après la transplantation, par géotypage de l'ADN testiculaire et à long terme, 1 an et demi ou 2 ans, par observation de descendants transgéniques.

En transplantant la fraction de spermatogonies A de testicule immature purifiée par élutriation et qui exprime fortement les marqueurs de SSCs, nous avons obtenu un fort taux de succès. En effet, par PCR nous avons montré qu'environ 80% des animaux testés possédaient le transgène dans leur gonade. À long terme, via la fécondation, nous avons pu confirmer ces résultats. Par exemple, pour une de nos expériences, sur 30 animaux testés, seuls 3 n'ont pas donné de descendance fluorescente. Nous avons donc une très bonne efficacité de résultats avec des fractions somme toute peu « triées ». Plusieurs éléments pourraient expliquer ces forts taux de succès. Premièrement, la transplantation a lieu avant la mise en place du système immunitaire ce qui limiterait donc les rejets par l'organisme receveur (Li and Leatherland, 2012). Deuxièmement, la physiologie native du testicule n'est pas altérée par des traitements destinés à éliminer la spermatogenèse endogène (busulfan, température, morpholinos). Même si il va y avoir compétition entre les cellules du receveur et du donneur pour la colonisation de la niche et la spermatogenèse, les régulations mises en jeu ne sont donc pas modifiées. Troisièmement, nous préparons et injectons beaucoup de cellules (autour de 10 000) par rapport



---

au protocole utilisé dans les autres espèces. Cependant, notre hypothèse forte est que la population de spermatogonies A d'immature contient une grande proportion de spermatogonies souches (20% si *nanos2* est un marqueur fiable). En conclusion, les spermatogonies A issues de testicules de truite immatures et qui possèdent les plus fort taux d'expression de gènes marqueurs de SSCs (*nanos2* et *nanos3*, *pou2*, *plzf* et *gfra1*) incluent une population de spermatogonies souches qui a une forte capacité à participer à la spermatogenèse d'un individu receveur.

Il est important de noter qu'aucune colonisation ectopique des cellules n'a été détectée 6 mois après la transplantation. Les cellules non souches ou non intégrées à la gonade ont dû progressivement être dégradées et disparaître. Les spermatogonies souches, elles, ont spécifiquement répondu aux signaux de migrations émis par les cellules somatiques et ont recolonisé uniquement la niche germinale dans les gonades. La transmission du génome MLC2 à la descendance a été testée au cours du premier cycle de spermatogenèse. Cependant, on ne pouvait exclure que les cellules transplantées étaient des progéniteurs capables de rentrer en prolifération rapide et de se différencier en spermatozoïdes. Certains animaux ont donc été à nouveau testés à l'issue de leur second cycle de spermatogenèse. Sur 6 animaux testés, quatre ont à nouveau donné des descendants transgéniques. Grâce à ces données, nous pouvons affirmer qu'au moins une partie des cellules qui ont recolonisé la gonade embryonnaire ont maintenu leur aptitudes d'auto-renouvellement et de différenciation pendant 2 cycles annuels de spermatogenèse, traduisant bien leur caractéristique de cellules spermatogoniales souches.

L'objectif premier de la PCR et du test de fécondation était d'estimer un taux de transmission du transgène qui refléterait la proportion de spermatogonies souches transplantées. Pourtant, il s'est avéré qu'au sein d'une population transplantée avec la même population cellulaire de départ, les variations entre individus pouvaient être très grandes (de 0,5 à 28% de descendants transgéniques entre deux individus – le maximum avec du sperme MLC2 étant de 50%). Ces résultats pourraient en partie résulter de biais techniques (lieu de l'injection, nombre de cellules transplantées/embryon difficile à maîtriser, qualité biologique des cellules) ou d'une variabilité individuelle des receveurs. Néanmoins, l'estimation du taux de succès, i.e. si le transgène est détecté en PCR ou transmis à la descendance (réponse binaire) a permis de comparer significativement des populations différentes.

Après la mise au point de la transplantation et la vérification d'une population de spermatogonies souches au sein de la population de spermatogonies A transplantées, nous avons essayé de comparer l'efficacité de transplantation entre différentes populations de



---

cellules testiculaires chez l'animal mature. Le nombre d'embryons receveurs possédant le transgène dans leurs gonades était beaucoup plus faible en utilisant la fraction testiculaire totale (10%) ou la fraction de spermatogonies B (10%) par rapport à ceux transplantés avec la fraction de spermatogonies A (40%). Cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois, mais elle traduit bien le fait que la population contenant les spermatogonies A et avec les plus fort taux d'expression de marqueurs de spermatogonies souches (*nanos2 et nanos3, pou2, plzf et gfra1*) est enrichie en spermatogonies souches par rapport à la fraction de cellules testiculaires totale. Il est peu probable que la détection positive suite à une transplantation avec une fraction de spermatogonies B résulte de la dédifférenciation de ces cellules. Ce résultat s'explique peut-être par la présence de spermatogonies A (souches) dans la fraction élutriée de spermatogonies B.

En perspectives à court terme, nous aurions souhaité tester la transplantation à partir de fractions enrichies en spermatogonies souches via des protéines membranaires et triées par FACS. Cependant, à ce jour aucun marqueur membranaire (C-kit, CD9, integrineA6, SSEA1) à l'exception de *Gfra1* n'a été détecté à la surface de cellules spermatogoniales de truite à l'aide d'anticorps hétérologues. Alors que les analyses en cytométrie montraient de façon répétée une population *Gfra1* positive, à deux reprises le tri préparatif par FACS avec un anti-*gfra1a* n'a pas permis d'enrichir une population en cellules porteuses des marqueurs SSCs. Le tri sur *gfra1* reste encore à mettre au point, cependant chez les mammifères peu ou pas d'enrichissement n'a été observé avec le tri sur ce marqueur.

Autre perspective sur ce point, il serait tout à fait intéressant d'examiner le succès de transplantations à partir d'une population de spermatogonies isolées d'individus spermiant. En effet, beaucoup d'indices tendent à confirmer que presque toutes ou toutes les spermatogonies A résiduelles bordant les tubes séminifères dans le testicule spermiant sont des spermatogonies souches. Cependant, dans nos premiers essais, le testicule spermiant s'est avéré très difficilement manipulable. En effet, le testicule est rempli de milliards de spermatozoïdes qui ne sont qu'en partie éliminés par gradient de Percoll et empêchent de procéder à une éluatriation centrifuge des spermatogonies A. Les spermatozoïdes s'agrègent entre eux en très grands paquets qui sont triés avec les grosses spermatogonies et colmatent l'arrivée de liquide nécessaire pour l'éluatriation.

En conclusion, grâce à l'utilisation d'une lignée transgénique, nous avons pu estimer l'efficacité de transplantation, par PCR et par fécondation. Cela nous a permis de montrer que des fractions de spermatogonies A isolées de testicules immature et mature, populations germinales qui



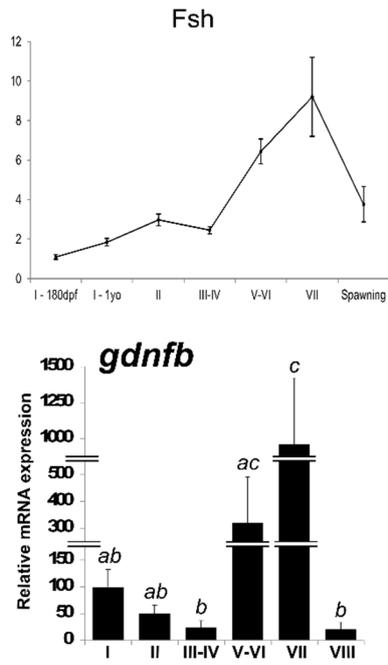
---

expriment les plus forts taux d'expression de marqueurs de spermatogonies souches (*gfra1*, *nanos2* et *3*, *plzf*, *pou2* et *gfra1*), sont les fractions qui ont aussi montré le plus fort taux de succès de la transplantation. Ces fractions cellulaires incluent donc la population de spermatogonies souches capables de coloniser le testicule et de se différencier après transplantation.

## **5. Des voies de régulation locales et périphériques de la destinée des spermatogonies**

Le deuxième volet de ma thèse fut d'aborder les voies de régulations contrôlant la destinée des SSCs, auto-renouvellement versus différenciation. Parmi plusieurs facteurs décrits pour influencer le devenir des SSCs de mammifères, GDNF apparaît comme un acteur clé (Hofmann et al., 2005; Kubota et al., 2004; Meng et al., 2000). Nos travaux ont montré que des orthologues truite de *gdnf* et de son récepteur *gfra1* sont exprimés dans le testicule et le système nerveux central de truite. En particulier, *gfra1a* est exprimé par une sous-population des spermatogonies indifférenciées (<15% par expérience de cytométrie) présentes dans le testicule immature et mature. *gdnfb* semble exprimé par un compartiment somatique testiculaire mais probablement pas par des cellules de Sertoli. Ces informations soutiennent l'implication de la voie Gdnf-Gfra1 sur la régulation de la destinée cellulaire des SSCs de truite. La localisation de l'expression de *gdnf* a été obtenue de manière indirecte par PCR quantitative sur fraction de cellules testiculaires isolées. Nous souhaitons affiner ce résultat par des techniques de localisation *in situ* de l'expression. Malgré plusieurs tentatives d'hybridation *in situ* avec une sonde spécifique dirigée contre *gdnfb*, et malgré l'analyse de plusieurs stades de spermatogenèse (dont le stade VII), aucun signal spécifique n'a pu être obtenu jusqu'à présent. La sonde anti-sens et la sonde sens (contrôle) montrent des signaux similaires. En perspectives, le premier objectif à court terme serait de poursuivre une analyse *in situ* de l'expression de *gdnf*. Une première approche serait de cloner une nouvelle sonde ciblant un autre domaine de la séquence du transcrit et de la tester en HIS sur des coupes de testicules à divers stades de la spermatogenèse. Une autre approche serait de faire produire un anticorps spécifique dirigé contre le *gdnf* de truite et d'analyser directement le profil d'expression de la protéine.

Au vu des profils d'expression de *gdnf* et de son récepteur *gfra1* dans le testicule, notre étude permet de conclure à une implication de cette voie dans le contrôle de la destinée des SSCs. Il serait maintenant nécessaire de confirmer le rôle fonctionnel de cette voie de signalisation via



**Figure 45 : Le taux plasmatique de Fsh circulante est corrélé au profil d'expression de *gdnfb* dans le testicule au cours du cycle spermatogénétique.**

---

des techniques d'inactivation ou de surexpression de gènes. Chez la souris, le KO homozygote de *gdnf* est létal, du fait de défauts de développement embryonnaire, probablement issus du rôle connu de *gdnf* dans la neurogenèse. Toutefois, le KO hétérozygote de ce gène est informatif et se traduit par la perte progressive des cellules germinales au sein du testicule (Meng et al., 2000). Par des techniques de transgénèse désormais maîtrisées dans notre équipe, il est envisageable d'étudier les défauts induits sur la survie et la prolifération des cellules germinales souches. A l'inverse, le Knock In permettrait d'étudier les effets de la surexpression de *Gdnf*, le facteur de croissance, ou de *Gfra1* son récepteur.

L'activité des Sertoli, notamment sur la régulation de la prolifération des spermatogonies, est régulée par une hormone gonadotrope, la FSH chez les mammifères et les poissons (Kumar, 2005 ;Allan et al., 2004; Chang et al., 2004). De plus, des études menées chez la souris montrent une action stimulatrice de FSH sur l'expression de GDNF (Tadokoro et al., 2002). FSH serait donc impliquée dans la régulation de la destinée des SSCs à travers son contrôle sur la voie GDNF-GFRA1. Notre groupe a montré que chez la truite, la Fsh est sécrétée dès le début du cycle spermatogénétique à la puberté, *i.e.* l'entrée en prolifération active des spermatogonies. La Lh, elle, n'est pas détectée. Le taux plasmatique de Fsh s'élève transitoirement au stade II puis va atteindre des niveaux élevés de sécrétion juste avant la fin du cycle spermatogénétique (Figure 45). Nos résultats montrent qu'une forte élévation du transcrit *gdnf* coïncide avec ce deuxième pic de sécrétion de Fsh. Ces résultats suggéreraient une régulation positive de *gdnf* par Fsh (directe ou indirecte) cohérente avec les données mammifères. Toutefois, *in vitro*, l'addition de Fsh n'a pas stimulé l'expression de *gdnfb*. Dans notre système de culture d'explants, après 96 h de culture en conditions basales, l'expression de *gdnfb* augmente tandis qu'avec Fsh cette augmentation est abolie et le taux de transcrit maintenu au taux du T0 de culture. Des résultats similaires ont été observés dans 3 expériences indépendantes suggérant que Fsh est nécessaire à la stabilité de la transcription du *gdnfb*.

Il est toujours difficile de comparer les données obtenues *in vivo* et *in vitro* du fait du système intégrant des régulations complexes pour le premier, et du milieu de culture partiellement contrôlé du deuxième. De plus, la Fsh a des rôles différents suivant le stade de la spermatogenèse. Sa sécrétion en début de cycle serait impliquée dans l'initiation de la prolifération active des spermatogonies tandis que son élévation en fin de cycle coïncide avec la spermiogenèse et l'arrêt des proliférations spermatogoniales (Gomez et al., 1999). On ne peut donc exclure que l'effet de la Fsh sur *gdnf* varie en fonction de la situation physiologique du testicule. Or, nous avons utilisé des cultures d'explants de testicule immatures aux stades I-III



---

tandis que le pic d'expression de *gdnf* chez la truite à lieu aux stades plus avancés (stades V-VII). Il serait donc judicieux d'évaluer l'effet de Fsh en fin de cycle sur la voie *gdnf-gfra1*.

Parmi plusieurs facteurs décrits pour influencer le devenir des SSCs de mammifères, *gdnf* est le seul indispensable pour leur maintien à long terme en culture *in vitro*. Son action est généralement interprétée comme la stimulation de la prolifération des spermatogonies souches (auto-renouvellement) puisque leur nombre augmente progressivement au cours de la culture (Braydich-Stolle et al., 2007; Hofmann et al., 2005). Pourtant, au vu de ces observations, son action pourrait aussi être de maintenir la survie de la cellule par des effets anti-apoptotiques (Travaux de thèse d'Adrien Bosseboeuf chez la roussette) ou de maintenir l'état indifférencié de cellules souches qui, par ailleurs, prolifèrent spontanément. Dans notre modèle, l'élévation très marquée de *gdnfb* en fin de cycle liée à l'arrêt progressif de la production de cystes à spermatogonies différenciées soutient un effet "anti-différenciation" de ce facteur sur les SSCs, et permet de proposer un rôle du *gdnfb* dans l'arrêt de la spermatogenèse active.

D'autre part, l'expression du récepteur de *gdnf*, *gfra1*, est stimulée suite au traitement Fsh *in vitro* dans nos conditions de culture. Ce résultat très original permet de proposer que dans ce modèle de téléostéen, l'action positive de la Fsh sur la voie Gdnf-Gfra1 passe par l'augmentation du nombre de récepteurs exprimés par cellule.

En termes de perspectives, le rôle de Gdnf pourra être testé *in vitro* ou *in vivo*. Dans nos conditions basales de culture d'explants (sans sérum, insuline ou facteur de croissance mais en conservant la structure fonctionnelle du testicule), l'expression observée de *gdnf* pourrait affecter le devenir des SSCs. Afin d'étudier plus finement ce phénomène, il serait intéressant de bloquer la voie de signalisation Gdnf-Gfra1 soit en agissant directement sur le facteur grâce à un anticorps spécifique, soit sur le récepteur via un « compétiteur » ou encore de tester son action en ajoutant du *gdnf* exogène (hétérologue mammalien ou synthétique de truite) dans notre milieu de culture. Il s'agirait ensuite d'analyser le devenir des spermatogonies en culture à l'aide de marqueurs de prolifération (indice BrdU et croissance de colonies) et/ou de marqueurs moléculaires de la différenciation (marqueurs de spermatogonies indifférenciées comme *nanos2* et *nanos3*, *pou2*, *plzf* et *gfra1* versus marqueurs de méiose (*sycp3*,...)). De plus, dans plusieurs modèles, la culture de cellules germinales (CGPss, OSCs et SSCs) est améliorée par l'ajout de facteurs combinés en culture. Notamment, l'addition de FGF2 (bFGF) potentialise la régulation de *gdnf* sur le devenir des SSCs de mammifères en culture et l'étude



---

de ce facteur dans nos cultures constitue une perspective intéressante de travail afin d'améliorer nos conditions d'expansions de SSCs *in vitro* (Kanatsu-Shinohara et al., 2003, 2005, 2006).

Un autre régulateur du destin des spermatogonies a été abordé dans mes travaux: Le SCF (ou KIT LIGAND) qui, à la différence de GDNF, est décrit comme stimulateur de la prolifération des spermatogonies A différenciées (Ohta et al., 2000, 2003). Nous démontrons ici l'expression de certains acteurs qui nous permettent de proposer l'implication de cette voie dans la niche germinale chez la truite. Cependant nous savons depuis peu que deux *c-kit* et quatre ligands potentiels sont présents dans le génome de la truite, or les résultats acquis dans notre étude ne concernent que certains paralogues. Nos travaux sur cette voie de signalisation sont donc encore partiels et leur interprétation encore très préliminaire. Le *c-kita* apparaît exprimé par les fractions de spermatogonies A de truites immatures et matures mais peu par les spermatogonies B, et ces résultats ne sont donc pas incohérents avec son implication dans les spermatogonies A différenciées. Tandis que *kit liganda1* semble exprimé par les cellules somatiques, l'autre *kit ligand* (*kitla2*) est curieusement exprimé préférentiellement par les populations de cellules germinales isolées. Des analyses par hybridation *in situ* (en cours) permettront d'affiner ces résultats. Au cours de la spermatogenèse, l'expression de *c-kita* et de *kitla1* coïncide avec l'entrée en prolifération active des spermatogonies A et de la différenciation en spermatogonies B. Leur expression augmente à nouveau dans le testicule "spermiant" ne contenant plus que des spermatozoïdes et des spermatogonies A inactives, suggérant l'expression de *c-kit* par des spermatogonies indifférenciées. Ce résultat n'est pas incohérent avec un rôle plus tardif du récepteur, et le mRNA *c-kit* a aussi été détecté dans les spermatogonies indifférenciées chez les mammifères. Nos données actuelles montrant l'expression forte de *c-kit* et de ses ligands en début et fin de cycle supportent globalement un rôle de cette voie de signalisation sur la biologie des spermatogonies (prolifération ?). En perspectives, nous devons compléter l'étude des transcrits.

De plus nous avons montré par immunocytochimie que l'anticorps C-KIT mammalien marque une population de cellules spermatogoniales au sein d'une fraction testiculaire totale d'immature. Grâce à cet anticorps, nous pourrions poursuivre l'analyse du profil d'expression de C-kit sur d'autres fractions de cellules germinales et /ou d'analyser la localisation de la protéine C-kit directement dans le testicule par immunohistochimie. Cela permettrait de préciser quelles fractions des cellules germinales au sein du testicule pré-pubère et spermiant sont marquées. Enfin, nous détectons une expression très élevée (par rapport aux autres stades) de *c-kit* et de *kit ligand* dans l'embryon de 55 jpf. Or la voie C-KIT et KIT LIGAND est aussi



---

connue pour son rôle majeur dans la prolifération et la migration des CGPs et des gonocytes chez les mammifères (Buehr et al., 1993; Gu et al., 2009; Ohbo et al., 2003; Orth et al., 1997). Une étude ayant décrit un pic de prolifération des « gonocytes » de truite dans l'embryon vers 55-60 jpf, notre résultat suggère une implication potentielle de C-kit et de Kit ligand dans le contrôle de cette régulation (Lebrun et al., 1982). En perspectives, l'analyse fine de cette période de développement -combinant l'hybridation *in toto* et la PCRq de *c-kit* et *kitl* reliée à la quantification des proliférations germinales- pourrait éclairer les mécanismes précoces impliqués dans la prolifération des « gonocytes ».

## 6. Et maintenant ?

Deux perspectives biotechnologiques de mes travaux d'identification des spermatogonies souches chez la truite ont été abordées en fin de thèse, en collaboration avec nos collègues du groupe "Cryoconservation et régénération des génomes".

La première perspective biotechnologique est née d'une interrogation fondamentale : chez la truite, il a été montré que les cellules souches spermatogoniales sont bipotentes puisqu'elles peuvent coloniser et participer à l'ovogenèse si elles sont transplantées dans des individus femelles. Les SSCs étant aptes à régénérer de la spermatogenèse et de l'ovogenèse, ont-elles d'autres aptitudes (pluripotence) et sont-elles aptes à régénérer un individu entier (totipotence) ?

L'absence de détection "ectopique" du transgène MLC2 dans divers organes en contact avec la cavité abdominale laisserait entendre que ces cellules peuvent seulement intégrer et coloniser la gonade après transplantation embryonnaire. Pour tester la totipotence des SSCs de truite, nous avons initié une étude par transfert de spermatogonies A indifférenciées dans des ovules non fécondés : approche assimilée au "transfert nucléaire" ou "clonage" tel qu'il est pratiqué chez les poissons. Durant les premiers essais de transfert de spermatogonies nous n'avons pas procédé à la culture *in vitro* qui aurait pu affecter la destinée cellulaire des SSCs, ni à l'inactivation du génome maternel de l'ovocyte. Après injection de spermatogonies isolées de testicule immature transgéniques MLC2 dans un œuf de truite, nous observons le développement d'embryons jusqu'au stade blastula. Aucun développement au-delà n'a pour le moment été observé. Les cellules embryonnaires ainsi formées ont été récoltées et leur ADN extraits. Cependant, en raison de problèmes techniques de génotypage nous n'avons pour le moment pu confirmer la présence du transgène *mlc2::GFP* dans ces cellules et donc le développement au stade blastula pourrait être sous-tendu sur les transcrits d'origine maternelle.



---

L'autre hypothèse serait que les cellules injectées n'étaient pas suffisamment indifférenciées pour permettre un développement au-delà de la MBT.

La deuxième perspective biotechnologique concerne la conservation des cellules germinales de type SSCs à des fins expérimentales pour leurs études ultérieures ou à des fins de conservation des génomes (intérêt agronomique ou espèces en danger d'extinction).

Chez les poissons, on ne sait pas congeler des ovocytes ou des embryons du fait de la présence nécessaire du vitellus. La congélation et la conservation des cellules souches est donc une alternative favorable pour la conservation des génomes chez ces espèces. Nous sommes actuellement en cours de mise au point de la congélation des spermatogonies souches de truite. Leur aptitude à coloniser la gonade et produire des spermatozoïdes fertiles après décongélation devra être vérifiée. Pour cela, une population isolée de spermatogonies A indifférenciées de truites transgéniques MLC2 immatures a été cryoconservée. Après décongélation et estimation du taux de survie, certaines cellules vont être testées en transplantation dans des embryons de truite de 30 jpf. Si par génotypage, nous détectons le transgène dans la gonade après plusieurs mois de développement, nous pourrions valider le fait que les cellules cryoconservées ont maintenu leur caractéristique souche et sont donc d'intérêt pour la conservation des génomes.

Ces deux perspectives sont développées dans le cadre du WP2 "Cellules germinales et cellules souches" du contrat CRB ANIM (volet espèces aquatiques coordonné par Catherine Labbé).



---

## Conclusion générale

Au commencement de cette thèse, la thématique des spermatogonies souches était une thématique nouvelle au sein de l'équipe Physiologie Testiculaire et Puberté. Ces travaux ont donc nécessité dans un premier temps l'intégration des connaissances sur les spermatogonies souches décrites dans la littérature ainsi que l'adaptation des techniques à notre modèle d'étude, la truite arc-en-ciel. De par son cycle spermatogénétique très saisonné ainsi que la facilité de manipulation des gonades et leur taille qui permet donc l'accès à des cellules germinales en grand nombre, la truite arc-en-ciel s'est révélée être un modèle de choix pour l'étude des spermatogonies souches. En effet, nous avons pu étudier finement les profils d'expression géniques de facteurs mis en jeu aux stades clés de la régulation du devenir des spermatogonies ainsi que dans des fractions de cellules testiculaires isolées (somatiques et germinales). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que plusieurs gènes connus pour être impliqués dans le fonctionnement des spermatogonies souches chez les mammifères (*nanos2* et *3*, *pou2*, *plzf*, et *gfra1*), s'expriment dans les spermatogonies les plus indifférenciées chez la truite et donc 1- jouent probablement un rôle similaire dans des espèces phylogénétiquement éloignées, et surtout 2- nous fournissent plusieurs marqueurs pour repérer *in situ*, isoler, purifier, puis étudier *in vitro* le devenir de ces cellules en conditions expérimentales. En particulier, *nanos2* est exprimé dans une sous-population de ces cellules que nous postulons être les spermatogonies souches de truite. À l'avenir, ce marqueur va permettre de caractériser la présence de spermatogonies souches au sein d'une population de cellules testiculaires en culture par exemple. Par ailleurs, grâce à la technique de MET, nous avons pu mettre en évidence que les cellules germinales indifférenciées dans le testicule de truite mature sont présentes isolées et sous forme de doublets. La nature biologique des doublets est encore à élucider, c'est-à-dire déterminer s'il s'agit d'un stade de prolifération des SSCs ou d'un stade de différenciation de ces cellules. Dans le deuxième volet de mon projet de thèse, nous avons mis en évidence que la voie *gdnf-gfra1*, régulateur majeur du maintien des spermatogonies souches chez les mammifères, est exprimé au sein du testicule de truite. Cette découverte est encourageante pour l'identification d'un facteur favorable au maintien en culture des spermatogonies souches. L'objectif de l'équipe à court terme sera d'étudier précisément le rôle de *gdnf* sur des cultures de spermatogonies indifférenciées isolées de testicule de truite. Enfin, nous avons adapté avec succès une technique de transplantation de cellules souches dans la cavité péritonéale d'embryon de 30 jpf et mis au point un protocole qui permet d'évaluer la présence de spermatogonies souches dans la fraction cellulaire transplantée. Cette technique permettra donc



---

à l'équipe de tester l'aptitude souche de fractions cellulaires enrichies en SSCs (par des marqueurs membranaires) ou de cellules ayant subi différents traitements (hormones, facteurs de croissance,...). Actuellement, cette technique est utilisée pour tester l'effet de la cryoconservation/décongélation sur la survie et le maintien de l'aptitude souche des SSCs.

En conclusion finale, ces travaux de thèse ont permis d'identifier *nanos2* comme marqueur des spermatogonies souches chez la truite. *Gdnf*, est proposé un comme régulateur du maintien des cellules souches spermatogoniales de truite au vu de son profil d'expression transcriptionnelle. Enfin, une méthode de transplantation pour tester le caractère souches des cellules a été adaptée au laboratoire. Ces travaux donnent lieu à plusieurs publications (une en révision mineure, une soumise et une en préparation) et ont été présentés dans trois congrès internationaux. Ils ont permis d'élargir les connaissances et les compétences de l'équipe sur les spermatogonies souches de truite. Ils seront le support d'études futures plus approfondies sur le devenir des SSCs, auto-renouvellement ou différenciation, *in vivo* et *in vitro*.



---

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



---

- A -

Ahmed, E.A., Barten-van Rijbroek, A.D., Kal, H.B., Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S.C., van Pelt, A.M.M., and de Rooij, D.G. (2009). Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol. Reprod.* *80*, 1084–1091.

Airaksinen, M.S., and Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 383–394.

Airaksinen, M.S., Holm, L., and Hatinen, T. (2006). Evolution of the GDNF family ligands and receptors. *Brain. Behav. Evol.* *68*, 181–190.

Allan, C.M., Garcia, A., Spaliviero, J., Zhang, F.-P., Jimenez, M., Huhtaniemi, I., and Handelsman, D.J. (2004). Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology* *145*, 1587–1593.

Allard, E.K., Blanchard, K.T., and Boekelheide, K. (1996). Exogenous stem cell factor (SCF) compensates for altered endogenous SCF expression in 2,5-hexanedione-induced testicular atrophy in rats. *Biol. Reprod.* *55*, 185–193.

Allendorf, F.W., and Utter, F.M. (1976). Gene duplication in the family Salmonidae. III. Linkage between two duplicated loci coding for aspartate aminotransferase in the cutthroat trout (*Salmo clarki*). *Hereditas* *82*, 19–24.

Amer, M.A., Miura, T., Miura, C., and Yamauchi, K. (2001). Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol. Reprod.* *65*, 1057–1066.

Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M., and Page, D.C. (2008). *Stra8* and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14976–14980.

Anderson, R., Schaible, K., Heasman, J., and Wylie, C. (1999). Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. *J. Reprod. Fertil.* *116*, 379–384.

Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5319–5323.

Aravin, A.A., van der Heijden, G.W., Castañeda, J., Vagin, V.V., Hannon, G.J., and Bortvin, A. (2009). Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. *PLoS Genet.* *5*, e1000764.

Arkov, A.L., and Ramos, A. (2010). Building RNA-protein granules: insight from the germline. *Trends Cell Biol.* *20*, 482–490.

Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K., and Kobayashi, S. (1999). Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell Biol.* *1*, 431–437.

- B -

Ballow, D.J., Xin, Y., Choi, Y., Pangas, S.A., and Rajkovic, A. (2006). *Sohlh2* is a germ cell-specific bHLH transcription factor. *Gene Expr. Patterns GEP* *6*, 1014–1018.



- 
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., and Saillant, E. (2009). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* *3*, 118–135.
- Barroca, V., Lassalle, B., Coureuil, M., Louis, J.P., Le Page, F., Testart, J., Allemand, I., Riou, L., and Fouchet, P. (2009). Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo. *Nat. Cell Biol.* *11*, 190–196.
- Bartelmez, S.H., and Stanley, E.R. (1985). Synergism between hemopoietic growth factors (HGFs) detected by their effects on cells bearing receptors for a lineage specific HGF: assay of hemopoietin-1. *J. Cell. Physiol.* *122*, 370–378.
- Beer, R.L., and Draper, B.W. (2013). *nanos3* maintains germline stem cells and expression of the conserved germline stem cell gene *nanos2* in the zebrafish ovary. *Dev. Biol.* *374*, 308–318.
- Buj-Bello, A., Buchman, V.L., Horton, A., Rosenthal, A., and Davies, A.M. (1995). GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* *15*, 821–828.
- Bendel-Stenzel, M.R., Gomperts, M., Anderson, R., Heasman, J., and Wylie, C. (2000). The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech. Dev.* *91*, 143–152.
- Berishvili, G., D’Cotta, H., Baroiller, J.-F., Segner, H., and Reinecke, M. (2006). Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* *146*, 204–210.
- Besmer, P., Manova, K., Duttlinger, R., Huang, E.J., Packer, A., Gyssler, C., and Bachvarova, R.F. (1993). The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev. Camb. Engl. Suppl.* 125–137.
- Billard, R., and Breton, B. (1978). Rhythms of reproduction in teleost fish. *Rhythm. Act. Fishes* 31–53.
- Boitani, C., Politi, M.G., and Menna, T. (1993). Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biol. Reprod.* *48*, 761–767.
- Borge, O.J., Ramsfjell, V., Cui, L., and Jacobsen, S.E. (1997). Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood* *90*, 2282–2292.
- Bosseboeuf, A., Gautier, A., Auvray, P., Mazan, S., and Sourdaine, P. (2014). Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *Reprod. Camb. Engl.* *147*, 125–139.
- Bowles, J., and Koopman, P. (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* *134*, 3401–3411.
- Boulogne, B., Olaso, R., Levacher, C., Durand, P., and Habert, R. (1999). Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. *Int. J. Androl.* *22*, 356–365.
- Van Bragt, M.P.A., Roepers-Gajadien, H.L., Korver, C.M., Bogerd, J., Okuda, A., Eggen, B.J.L., de Rooij, D.G., and van Pelt, A.M.M. (2008). Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis. *Reprod. Camb. Engl.* *136*, 33–40.
- Brawley, C., and Matunis, E. (2004). Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science* *304*, 1331–1334.



---

Braydich-Stolle, L., Kostereva, N., Dym, M., and Hofmann, M.-C. (2007). Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev. Biol.* 304, 34–45.

Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089–1103.

Brinster, R.L., and Zimmermann, J.W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11298–11302.

Brinster, C.J., Ryu, B.-Y., Avarbock, M.R., Karagenc, L., Brinster, R.L., and Orwig, K.E. (2003). Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol. Reprod.* 69, 412–420.

Brummendorf, T.H., Dragowska, W., Zijlmans JMJM, Thornbury, G., and Lansdorp, P.M. (1998). Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. *J. Exp. Med.* 188, 1117–1124.

Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., and Braun, R.E. (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 36, 647–652.

Buageaw, A., Sukhwani, M., Ben-Yehudah, A., Ehmeke, J., Rawe, V.Y., Pholpramool, C., Orwig, K.E., and Schlatt, S. (2005). GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol. Reprod.* 73, 1011–1016.

Buchold, G.M., Coarfa, C., Kim, J., Milosavljevic, A., Gunaratne, P.H., and Matzuk, M.M. (2010). Analysis of microRNA expression in the prepubertal testis. *PloS One* 5, e15317.

Buckingham, M.E., and Meilhac, S.M. (2011). Tracing cells for tracking cell lineage and clonal behavior. *Dev. Cell* 21, 394–409.

Buehr, M., McLaren, A., Bartley, A., and Darling, S. (1993). Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 198, 182–189.

Bunting, K.D. (2002). ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 20, 11–20.

Byrne, P.V., Guilbert, L.J., and Stanley, E.R. (1981). Distribution of cells bearing receptors for a colony-stimulating factor (CSF-1) in murine tissues. *J. Cell Biol.* 91, 848–853.

- C -

Cai, W.B., Roberts, S.A., Bowley, E., Hendry, J.H., and Potten, C.S. (1997). Differential survival of murine small and large intestinal crypts following ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 145–155.

Campbell, B., Dickey, J.T., and Swanson, P. (2003). Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biol. Reprod.* 69, 2109–2117.

Campos-Junior, P.H.A., Costa, G.M.J., Lacerda, S.M.S.N., Rezende-Neto, J.V., de Paula, A.M., Hofmann, M.-C., and de França, L.R. (2012). The spermatogonial stem cell niche in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Biol. Reprod.* 86, 155, 1–10.



- 
- Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev. Cell* *12*, 503–514.
- Chang, P., Torres, J., Lewis, R.A., Mowry, K.L., Houliston, E., and King, M.L. (2004). Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* *15*, 4669–4681.
- Charest, N.J., Zhou, Z.X., Lubahn, D.B., Olsen, K.L., Wilson, E.M., and French, F.S. (1991). A frameshift mutation destabilizes androgen receptor messenger RNA in the Tfm mouse. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *5*, 573–581.
- Chen, C., Ouyang, W., Grigura, V., Zhou, Q., Carnes, K., Lim, H., Zhao, G.-Q., Arber, S., Kurpios, N., Murphy, T.L., et al. (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* *436*, 1030–1034.
- Chen, S.X., Bogerd, J., García-López, A., de Jonge, H., de Waal, P.P., Hong, W.S., and Schulz, R.W. (2010). Molecular cloning and functional characterization of a zebrafish nuclear progesterone receptor. *Biol. Reprod.* *82*, 171–181.
- Cheng, L., Gearing, D.P., White, L.S., Compton, D.L., Schooley, K., and Donovan, P.J. (1994). Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 3145–3153.
- Chevassus, B., Devaux, A., Chourrout, D., and Jalabert, B. (1988). Production of YY rainbow trout males by self-fertilization of induced hermaphrodites. *J. Hered.* *79*, 89–92.
- Chiarini-Garcia, H., and Russell, L.D. (2002). Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reprod. Camb. Engl.* *123*, 567–577.
- Chiarini-Garcia, H., Raymer, A.M., and Russell, L.D. (2003). Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reprod. Camb. Engl.* *126*, 669–680.
- Chieffi, P., Colucci D'Amato, L., Guarino, F., Salvatore, G., and Angelini, F. (2002). 17 beta-estradiol induces spermatogonial proliferation through mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1/2) activity in the lizard (*Podarcis s. sicula*). *Mol. Reprod. Dev.* *61*, 218–225.
- Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 39–48.
- Chuma, S., Hiyoshi, M., Yamamoto, A., Hosokawa, M., Takamune, K., and Nakatsuji, N. (2003). Mouse Tudor Repeat-1 (MTR-1) is a novel component of chromatoid bodies/nuages in male germ cells and forms a complex with snRNPs. *Mech. Dev.* *120*, 979–990.
- Chuma, S., Hosokawa, M., Tanaka, T., and Nakatsuji, N. (2009). Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline: germinal granules in mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* *306*, 17–23.
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., and Schier, A.F. (2002). Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 14919–14924.
- Clarke, R.B., Anderson, E., Howell, A., and Potten, C.S. (2003). Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif.* *36 Suppl 1*, 45–58.



- 
- Clermont, Y. (1966a). Renewal of spermatogonia in man. *Am. J. Anat.* *118*, 509–524.
- Clermont, Y. (1966b). Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil. Steril.* *17*, 705–721.
- Clermont, Y., and Antar, M. (1973). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *Am. J. Anat.* *136*, 153–165.
- Clermont, Y., and Bustos-Obregon, E. (1968). Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted ?in toto? *Am. J. Anat.* *122*, 237–247.
- CLERMONT, Y., and LEBLOND, C.P. (1959). Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. *Am. J. Anat.* *104*, 237–273.
- Cloutier, R. (2010). The fossil record of fish ontogenies: insights into developmental patterns and processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 400–413.
- Cohen, P.E., Hardy, M.P., and Pollard, J.W. (1997). Colony-stimulating factor-1 plays a major role in the development of reproductive function in male mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *11*, 1636–1650.
- Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Bühring, H.-J., Mattheus, U., Mack, A., et al. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* *456*, 344–349.
- Cooke, J.E., Godin, I., Ffrench-Constant, C., Heasman, J., and Wylie, C.C. (1993). Culture and manipulation of primordial germ cells. *Methods Enzymol.* *225*, 37–58.
- Costa, G.M.J., Avelar, G.F., Rezende-Neto, J.V., Campos-Junior, P.H.A., Lacerda, S.M.S.N., Andrade, B.S.C., Thomé, R.G., Hofmann, M.-C., and Franca, L.R. (2012). Spermatogonial stem cell markers and niche in equids. *PloS One* *7*, e44091.
- Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., and Pandolfi, P.P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* *36*, 653–659.
- Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D., and Lin, H. (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* *12*, 3715–3727.
- Cox, D.N., Chao, A., and Lin, H. (2000). piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 503–514.
- Creemers, L.B., Meng, X., den Ouden, K., van Pelt, A.M.M., Izadyar, F., Santoro, M., Sariola, H., and de Rooij, D.G. (2002). Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol. Reprod.* *66*, 1579–1584.
- Culty, M. (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *87*, 1–26.

**- D -**

- Dann, C.T., Alvarado, A.L., Molyneux, L.A., Denard, B.S., Garbers, D.L., and Porteus, M.H. (2008). Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires OCT4, a Factor Downregulated During Retinoic Acid-Induced Differentiation. *Stem Cells* *26*, 2928–2937.



---

deCuevas, M., Lee, J.K., and Spradling, A.C. (1996). alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Development* *122*, 3959–3968.

Deng, W., and Lin, H. (1997). Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *189*, 79–94.

Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* *2*, 819–830.

Devlin, R.H., and Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* *208*, 191–364.

Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M., and Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13612–13617.

Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Köprunner, M., Dörries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* *111*, 647–659.

Draper, B.W., McCallum, C.M., and Moens, C.B. (2007). nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. *Dev. Biol.* *305*, 589–598.

Duvillié, B., Attali, M., Aiello, V., Quemeneur, E., and Scharfmann, R. (2003). Label-retaining cells in the rat pancreas: location and differentiation potential in vitro. *Diabetes* *52*, 2035–2042.

Dym, M., He, Z., Jiang, J., Pant, D., and Kokkinaki, M. (2009). Spermatogonial stem cells: unlimited potential. *Reprod. Fertil. Dev.* *21*, 15–21.

## - E -

Ebata, K.T., Zhang, X., and Nagano, M.C. (2005). Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. *Mol. Reprod. Dev.* *72*, 171–181.

Eddy, E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* *43*, 229–280.

Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* *137*, 4796–4805.

Ehmcke, J., and Schlatt, S. (2006). A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reprod. Camb. Engl.* *132*, 673–680.

Elling, U., Klasen, C., Eisenberger, T., Anlag, K., and Treier, M. (2006). Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 16319–16324.

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

Extavour, C.G., and Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 5869–5884.



---

**- F -**

- Falender, A.E., Freiman, R.N., Geles, K.G., Lo, K.C., Hwang, K., Lamb, D.J., Morris, P.L., Tjian, R., and Richards, J.S. (2005). Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev.* *19*, 794–803.
- Fan, L., Moon, J., Wong, T.-T., Crodian, J., and Collodi, P. (2008). Zebrafish primordial germ cell cultures derived from vasa::RFP transgenic embryos. *Stem Cells Dev.* *17*, 585–597.
- Filipponi, D., Hobbs, R.M., Ottolenghi, S., Rossi, P., Jannini, E.A., Pandolfi, P.P., and Dolci, S. (2007). Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 6770–6781.
- Forbes, A., and Lehmann, R. (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 679–690.
- Förstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E., and Zamore, P.D. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol.* *3*, e236.
- Fouchécourt, S., Godet, M., Sabido, O., and Durand, P. (2006). Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J. Endocrinol.* *190*, 59–71.
- Francastel, C., Schübeler, D., Martin, D.I., and Groudine, M. (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 137–143.
- Frimberger, A.E., Sterling, A.I., and Quesenberry, P.J. (2001). Characterization of engraftable hematopoietic stem cells in murine long-term bone marrow cultures. *Exp. Hematol.* *29*, 643–652.
- Froschauer, A., Braasch, I., and Volff, J.-N. (2006). Fish Genomes, Comparative Genomics and Vertebrate Evolution. *Curr. Genomics* *7*, 43–57.

**- G -**

- Gao, M., and Arkov, A.L. (2013). Next generation organelles: structure and role of germ granules in the germline. *Mol. Reprod. Dev.* *80*, 610–623.
- Gabillard, J.-C., Rallièrè, C., Sabin, N., and Rescan, P.-Y. (2010). The production of fluorescent transgenic trout to study in vitro myogenic cell differentiation. *BMC Biotechnol.* *10*, 39.
- Garcia-Morales, C., Rothwell, L., Moffat, L., Garceau, V., Balic, A., Sang, H.M., Kaiser, P., and Hume, D.A. (2014). Production and characterisation of a monoclonal antibody that recognises the chicken CSF1 receptor and confirms that expression is restricted to macrophage-lineage cells. *Dev. Comp. Immunol.* *42*, 278–285.
- Gassei, K., and Orwig, K.E. (2013). SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. *PLoS One* *8*, e53976.
- Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 94–108.
- Gilboa, L., Forbes, A., Tazuke, S.I., Fuller, M.T., and Lehmann, R. (2003). Germ line stem cell differentiation in *Drosophila* requires gap junctions and proceeds via an intermediate state. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 6625–6634.



- 
- Gillis, A.J.M., Stoop, H., Biermann, K., van Gorp, R.J.H.L.M., Swartzman, E., Cribbes, S., Ferlinz, A., Shannon, M., Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H.J. (2011). Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *Int. J. Androl.* *34*, e160–174.
- Ginsburg, M., Snow, M.H., and McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* *110*, 521–528.
- Glaser, T., Opitz, T., Kischlat, T., Konang, R., Sasse, P., Fleischmann, B.K., Engel, W., Nayernia, K., and Brüstle, O. (2008). Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 2434–2443.
- Goel, S., Fujihara, M., Minami, N., Yamada, M., and Imai, H. (2008). Expression of NANOG, but not POU5F1, points to the stem cell potential of primitive germ cells in neonatal pig testis. *Reprod. Camb. Engl.* *135*, 785–795.
- Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., and Le Gac, F. (1999). Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* *113*, 413–428.
- González, B., Denzel, S., Mack, B., Conrad, M., and Gires, O. (2009). EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 1782–1791.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* *183*, 1797–1806.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 48–58.
- Grier, H.J. (1976). Sperm development in the teleost *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res.* *168*, 419–431.
- Griswold, M.D., Bishop, P.D., Kim, K.H., Ping, R., Siiteri, J.E., and Morales, C. (1989). Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *564*, 154–172.
- Griswold, M.D., Hogarth, C.A., Bowles, J., and Koopman, P. (2012). Initiating meiosis: the case for retinoic acid. *Biol. Reprod.* *86*, 35.
- Gu, Y., Runyan, C., Shoemaker, A., Surani, A., and Wylie, C. (2009). Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 1295–1303.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., et al. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* *440*, 1199–1203.
- Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* *315*, 1587–1590.
- Gupta, Y.K., Lee, T.H., Edwards, T.A., Escalante, C.R., Kadyrova, L.Y., Wharton, R.P., and Aggarwal, A.K. (2009). Co-occupancy of two Pumilio molecules on a single hunchback NRE. *Rna- Publ. Rna Soc.* *15*, 1029–1035.



- 
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146–1150.
- Hanington, P.C., Hitchen, S.J., Beamish, L.A., and Belosevic, M. (2009). Macrophage colony stimulating factor (CSF-1) is a central growth factor of goldfish macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 1–9.
- Hao, J., Yamamoto, M., Richardson, T.E., Chapman, K.M., Denard, B.S., Hammer, R.E., Zhao, G.Q., and Hamra, F.K. (2008). Sohlh2 knockout mice are male-sterile because of degeneration of differentiating type A spermatogonia. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1587–1597.
- Hashimoto, Y., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K., and Inoue, K. (2004). Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Dev. Biol.* 268, 152–161.
- Hätinen, T., Holm, L., and Airaksinen, M.S. (2007). Loss of neurturin in frog--comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 155–167.
- Hayashi, K., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Kaneda, M., Tang, F., Hajkova, P., Lao, K., O'Carroll, D., Das, P.P., Tarakhovsky, A., Miska, E.A., et al. (2008). MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One* 3, e1738.
- Hellmich, H.L., Kos, L., Cho, E.S., Mahon, K.A., and Zimmer, A. (1996). Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech. Dev.* 54, 95–105.
- Hermann, B.P., Sukhwani, M., Hansel, M.C., and Orwig, K.E. (2010). Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reprod. Camb. Engl.* 139, 479–493.
- Höck, J., and Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biol.* 9, 210.
- Hofmann, M.-C., Braydich-Stolle, L., and Dym, M. (2005). Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev. Biol.* 279, 114–124.
- Honaramooz, A., Snedaker, A., Boiani, M., Schöler, H., Dobrinski, I., and Schlatt, S. (2002). Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 418, 778–781.
- Honaramooz, A., Behboodi, E., Hausler, C.L., Blash, S., Ayres, S., Azuma, C., Echelard, Y., and Dobrinski, I. (2005). Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J. Androl.* 26, 698–705.
- Hong, Y., Liu, T., Zhao, H., Xu, H., Wang, W., Liu, R., Chen, T., Deng, J., and Gui, J. (2004). Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8011–8016.
- Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Philippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., et al. (2007). A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* 129, 69–82.
- Houwing, S., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2008). Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J.* 27, 2702–2711.
- Huckins, C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A radioautographic analysis of their cell cycle properties. *Cell Tissue Kinet.* 4, 313–334.
- Huckins, C., and Clermont, Y. (1968). Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. *Arch. Anat. Histol. Embryol. Norm. Expérimentales* 51, 341–354.



---

Huckins, C., and Oakberg, E.F. (1978). Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes. *Anat. Rec.* *192*, 519–528.

Huhtaniemi, I., Ahtiainen, P., Pakarainen, T., Rulli, S.B., Zhang, F.-P., and Poutanen, M. (2006). Genetically modified mouse models in studies of luteinising hormone action. *Mol. Cell. Endocrinol.* *252*, 126–135.

Hulspas, R., and Quesenberry, P.J. (2000). Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry* *40*, 245–250.

Huszar, J.M., and Payne, C.J. (2013). MicroRNA 146 (Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice. *Biol. Reprod.* *88*, 15.

Hutt, K.J., McLaughlin, E.A., and Holland, M.K. (2006). KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol. Reprod.* *75*, 421–433.

### - I -

Illmensee, K., and Mahowald, A.P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 1016–1020.

Izadyar, F., Den Ouden, K., Stout, T.A.E., Stout, J., Coret, J., Lankveld, D.P.K., Spoormakers, T.J.P., Colenbrander, B., Oldenbroek, J.K., Van der Ploeg, K.D., et al. (2003). Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reprod. Camb. Engl.* *126*, 765–774.

Izadyar, F., Wong, J., Maki, C., Pacchiarotti, J., Ramos, T., Howerton, K., Yuen, C., Greilach, S., Zhao, H.H., Chow, M., et al. (2011). Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *26*, 1296–1306.

### - J -

Jackson, K.A., Mi, T., and Goodell, M.A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14482–14486.

Jalabert, B., and Fostier, A. (2010). *La truite arc-en-ciel: Biologie et élevage* (Editions Quae).

Jan, S.Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M., and Vormer, T.L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1822*, 1838–1850.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., and Tilly, J.L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* *428*, 145–150.

Johnston, D.S., Olivas, E., DiCandeloro, P., and Wright, W.W. (2011). Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol. Reprod.* *85*, 763–769.

Johnston, D.S., Russell, L.D., Friel, P.J., and Griswold, M.D. (2001). Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology* *142*, 2405–2408.

Johnstone, R., Simpson, T.H., and Youngson, A.F. (1978). Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture* *13*, 115–134.



---

Juanchich, A., Le Cam, A., Montfort, J., Guiguen, Y., and Bobe, J. (2013). Identification of differentially expressed miRNAs and their potential targets during fish ovarian development. *Biol. Reprod.* 88, 128.

Juliano, C., Wang, J., and Lin, H. (2011). Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms. *Annu. Rev. Genet.* 45, 447–469.

Jung, J.G., Kim, D.K., Park, T.S., Lee, S.D., Lim, J.M., and Han, J.Y. (2005). Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 23, 689–698.

Jung, J.G., Lee, Y.M., Park, T.S., Park, S.H., Lim, J.M., and Han, J.Y. (2007). Identification, culture, and characterization of germline stem cell-like cells in chicken testes. *Biol. Reprod.* 76, 173–182.

**- K -**

Kai, T., and Spradling, A. (2004). Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* 428, 564–569.

Kai, T., Williams, D., and Spradling, A.C. (2005). The expression profile of purified *Drosophila* germline stem cells. *Dev. Biol.* 283, 486–502.

Kanatsu-Shinohara, M., and Shinohara, T. (2007). Culture and genetic modification of mouse germline stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1120, 59–71.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69, 612–616.

Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., et al. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119, 1001–1012.

Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., and Shinohara, T. (2005). Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biol. Reprod.* 72, 985–991.

Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Miki, H., Ogonuki, N., Takehashi, M., Morimoto, T., Ogura, A., and Shinohara, T. (2006). Clonal origin of germ cell colonies after spermatogonial transplantation in mice. *Biol. Reprod.* 75, 68–74.

Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., Takashima, S., Lee, J., Morimoto, H., Chuma, S., Raducanu, A., Nakatsuji, N., Fässler, R., and Shinohara, T. (2008a). Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell Stem Cell* 3, 533–542.

Kanatsu-Shinohara, M., Muneto, T., Lee, J., Takenaka, M., Chuma, S., Nakatsuji, N., Horiuchi, T., and Shinohara, T. (2008b). Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol. Reprod.* 78, 611–617.

Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Ishii, K., and Shinohara, T. (2011). Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PLoS One* 6, e23663.

Kaucher, A.V., Oatley, M.J., and Oatley, J.M. (2012). NEUROG3 is a critical downstream effector for STAT3-regulated differentiation of mammalian stem and progenitor spermatogonia. *Biol. Reprod.* 86, 164, 1–11.



- 
- Kerr, C.L., Hill, C.M., Blumenthal, P.D., and Gearhart, J.D. (2008). Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 412–421.
- Kersten, C.A., Krisfalusi, M., Parsons, J.E., and Cloud, J.G. (2001). Gonadal regeneration in masculinized female or steroid-treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* 290, 396–401.
- Kibanov, M.V., Kotov, A.A., and Olenina, L.V. (2013). Multicolor fluorescence imaging of whole-mount *Drosophila* testes for studying spermatogenesis. *Anal. Biochem.* 436, 55–64.
- Kiger, A.A., White-Cooper, H., and Fuller, M.T. (2000). Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. *Nature* 407, 750–754.
- Kirilly, D., and Xie, T. (2007). The *Drosophila* ovary: an active stem cell community. *Cell Res.* 17, 15–25.
- Klassen, H., Schwartz, M.R., Bailey, A.H., and Young, M.J. (2001). Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci. Lett.* 312, 180–182.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., and Nüsslein-Volhard, C. (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 421, 279–282.
- Ko, K., Tapia, N., Wu, G., Kim, J.B., Bravo, M.J.A., Sasse, P., Glaser, T., Ruau, D., Han, D.W., Greber, B., et al. (2009). Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 87–96.
- Kobayashi, A., Kwan, K.-M., Carroll, T.J., McMahon, A.P., Mendelsohn, C.L., and Behringer, R.R. (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2809–2823.
- Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M., and Kitamura, T. (1996). Essential role of the posterior morphogen *nanos* for germline development in *Drosophila*. *Nature* 380, 708–711.
- KOBAYASHI, M., Aida, K., and Stacey, N.E. (1991). Induction of Testis Development by Implantation of 11-Ketotestosterone in Female Goldfish. *Zoolog. Sci.* 8, p389–393.
- Kokkinaki, M., Lee, T.-L., He, Z., Jiang, J., Golestaneh, N., Hofmann, M.-C., Chan, W.-Y., and Dym, M. (2009). The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol. Reprod.* 80, 707–717.
- Kollet, O., Spiegel, A., Peled, A., Petit, I., Byk, T., Hershkovich, R., Guetta, E., Barkai, G., Nagler, A., and Lapidot, T. (2001). Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood* 97, 3283–3291.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2001). A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* 15, 2877–2885.
- Koshimizu, U., Watanabe, D., Tajima, Y., and Nishimune, Y. (1992). Effects of *W* (*c-kit*) gene mutation on gametogenesis in male mice: agametic tubular segments in *Wf/Wf* testes. *Dev. Camb. Engl.* 114, 861–867.
- Kotaja, N., and Sassone-Corsi, P. (2007). The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 85–90.



---

Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2474–2479.

Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2003). Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6487–6492.

Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16489–16494.

Kubota, H., Wu, X., Goodyear, S.M., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 2604–2614.

Kumar, T.R. (2005). What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? *Reprod. Camb. Engl.* *130*, 293–302.

Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., et al. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 839–849.

**- L -**

Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R., Assis, L.H., Resende, F.M., Campos-Silva, S.M., Campos-Silva, R., Segatelli, T.M., and Franca, L.R. (2008). Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybio* *32*, 115–118.

Lassalle, B., Bastos, H., Louis, J.P., Riou, L., Testart, J., Dutrillaux, B., Fouchet, P., and Allemand, I. (2004). “Side Population” cells in adult mouse testis express *Bcrp1* gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 479–487.

Lacerda, S.M.S.N., Costa, G.M.J., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., and França, L.R. (2013). Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiol. Biochem.* *39*, 3–11.

Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., and Hogan, B.L. (1999). *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* *13*, 424–436.

Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., and Schulz, R.W. (2009). Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol. Reprod.* *81*, 177–187.

Lebrun, C., Billard, R., and Jalabert, B. (1982). Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. *Reprod. Nutr. Dev.* *22*, 405–412.

Le Gac, F., Loir, M., le Bail, P.Y., and Ollitrault, M. (1996). Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.* *44*, 23–35.

Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A., and Lareyre, J.J. (2010). Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* *165*, 412–437.



- 
- Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 605–631.
- Li, M., and Leatherland, J.F. (2012). The interaction between maternal stress and the ontogeny of the innate immune system during teleost embryogenesis: implications for aquaculture practice. *J. Fish Biol.* 81, 1793–1814.
- Lim, C.Y., Tam, W.-L., Zhang, J., Ang, H.S., Jia, H., Lipovich, L., Ng, H.-H., Wei, C.-L., Sung, W.K., Robson, P., et al. (2008). Sall4 regulates distinct transcription circuitries in different blastocyst-derived stem cell lineages. *Cell Stem Cell* 3, 543–554.
- Lin, H., and Spradling, A.C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Dev. Camb. Engl.* 124, 2463–2476.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130–1132.
- Ling, V., and Neben, S. (1997). In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *J. Cell. Physiol.* 171, 104–115.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441.
- Liu, Y., Jiang, H., Crawford, H.C., and Hogan, B.L.M. (2003). Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development. *Dev. Biol.* 261, 10–24.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C., and Habert, R. (2002). Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reprod. Camb. Engl.* 124, 173–180.
- Loir, M. (1999). Spermatogonia of rainbow trout: I. Morphological characterization, mitotic activity, and survival in primary cultures of testicular cells. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 422–433.
- Loir, M., and Le Gac, F. (1994). Insulin-like growth factor-I and -II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogonia and spermatocytes. *Biol. Reprod.* 51, 1154–1163.
- Loir, M., Sourdaine, P., Mendis-Handagama, S.M., and Jégou, B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc. Res. Tech.* 32, 533–552.
- Loppion, G., Crespel, A., Martinez, A.-S., Auvray, P., and Sourdaine, P. (2008). Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus canicula* L. *Cell Tissue Res.* 332, 533–542.
- Lucini, C., Carla, L., Facello, B., Bruna, F., Maruccio, L., Lucianna, M., Langellotto, F., Fernanda, L., Sordino, P., Paolo, S., et al. (2010). Distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha-1 in the brain of adult zebrafish. *J. Anat.* 217, 174–185.
- Lyon, M.F., and Hawkes, S.G. (1970). X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 227, 1217–1219.

**- M -**

- Maduro, M.F. (2010). Cell fate specification in the *C. elegans* embryo. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 1315–1329.



- 
- Majhi, S.K., Hattori, R.S., Yokota, M., Watanabe, S., and Strüssmann, C.A. (2009). Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germlines. *PLoS One* 4, e6132.
- Mahato, D., Goulding, E.H., Korach, K.S., and Eddy, E.M. (2000). Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- $\alpha$  for development or function. *Endocrinology* 141, 1273–1276.
- Manders, P.M., Hunter, P.J., Telaranta, A.I., Carr, J.M., Marshall, J.L., Carrasco, M., Murakami, Y., Palmowski, M.J., Cerundolo, V., Kaeck, S.M., et al. (2005). BCL6b mediates the enhanced magnitude of the secondary response of memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7418–7425.
- Mandl, A.M., and Zuckerman, S. (1951). The Relation of Age to Numbers of Oocytes. *J. Endocrinol.* 7, 190–193.
- Manova, K., and Bachvarova, R.F. (1991). Expression of c-kit encoded at the W locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts. *Dev. Biol.* 146, 312–324.
- Marcon, E., Babak, T., Chua, G., Hughes, T., and Moens, P.B. (2008). miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 16, 243–260.
- Matsui, Y., Zsebo, K.M., and Hogan, B.L. (1990). Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* 347, 667–669.
- Mazurais, D., Montfort, J., Delalande, C., and Le Gac, F. (2005). Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 143–154.
- McIver, S.C., Roman, S.D., Nixon, B., and McLaughlin, E.A. (2012). miRNA and mammalian male germ cells. *Hum. Reprod. Update* 18, 44–59.
- McLachlan, R.I., Wreford, N.G., de Kretser, D.M., and Robertson, D.M. (1995). The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* 136, 4035–4043.
- McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 262, 1–15.
- McLean, D.J., Friel, P.J., Johnston, D.S., and Griswold, M.D. (2003). Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol. Reprod.* 69, 2085–2091.
- McLean, D.J., Friel, P.J., Pouchnik, D., and Griswold, M.D. (2002a). Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in follicle-stimulating hormone-treated rat Sertoli cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 16, 2780–2792.
- McLean, D.J., Russell, L.D., and Griswold, M.D. (2002b). Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* 66, 1374–1379.
- Meachem, S.J., McLachlan, R.I., Stanton, P.G., Robertson, D.M., and Wreford, N.G. (1999). FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. *J. Androl.* 20, 756–762; discussion 755.
- Meachem, S.J., Ruwanpura, S.M., Ziolkowski, J., Ague, J.M., Skinner, M.K., and Loveland, K.L. (2005). Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J. Endocrinol.* 186, 429–446.



- 
- Meehan, T., Schlatt, S., O'Bryan, M.K., de Kretser, D.M., and Loveland, K.L. (2000). Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev. Biol.* *220*, 225–237.
- Megosh, H.B., Cox, D.N., Campbell, C., and Lin, H. (2006). The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr. Biol.* *CB 16*, 1884–1894.
- Mellgren, E.M., and Johnson, S.L. (2005). *kitb*, a second zebrafish ortholog of mouse *Kit*. *Dev. Genes Evol.* *215*, 470–477.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., et al. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* *287*, 1489–1493.
- Meng, X., de Rooij, D.G., Westerdahl, K., Saarma, M., and Sariola, H. (2001). Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse testis. *Cancer Res.* *61*, 3267–3271.
- Meyer, A., and Van de Peer, Y. (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *27*, 937–945.
- Meyer, A., and Schartl, M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 699–704.
- Mikkola, M., Sironen, A., Kopp, C., Taponen, J., Sukura, A., Vilkki, J., Katila, T., and Andersson, M. (2006). Transplantation of normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. *Reprod. Domest. Anim. Zuchtthg.* *41*, 124–128.
- MINTZ, B., and RUSSELL, E.S. (1957). Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J. Exp. Zool.* *134*, 207–237.
- Minucci, S., Di Matteo, L., Chieffi, P., Pierantoni, R., and Fasano, S. (1997). 17 beta-estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. *J. Exp. Zool.* *278*, 93–100.
- Mitranond, V., Sobhon, P., Tosukhowong, P., and Chindaduangrat, W. (1979). Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. I. Quantitation of germinal cells in the seminiferous tubules. *Acta Anat. (Basel)* *103*, 159–168.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631–642.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., and Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 5774–5778.
- Miura, T., Miura, C., Konda, Y., and Yamauchi, K. (2002). Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 2689–2697.
- Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T., and Miura, C. (2006). Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7333–7338.
- Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., et al. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 4279–4286.



---

Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Chuma, S., Nakatsuji, N., Takehashi, M., and Shinohara, T. (2009). Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *PloS One* 4, e7909.

Morris, R.J., and Potten, C.S. (1999). Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J. Invest. Dermatol.* 112, 470–475.

Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 35–71.

Muffato, M., Louis, A., Poisnel, C.-E., and Crollius, H.R. (2010). Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. *Bioinformatics* 26, 1119–1121.

- N -

Nagahama, Y., Miura, T., and Kobayashi, T. (1994). The onset of spermatogenesis in fish. *Ciba Found. Symp.* 182, 255–267; discussion 267–270.

Nagano, M., Ryu, B.-Y., Brinster, C.J., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2003). Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod.* 68, 2207–2214.

Nagasawa, K., Shikina, S., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2010). Lymphocyte antigen 75 (Ly75/CD205) is a surface marker on mitotic germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 83, 597–606.

Nagler, J.J., Cavileer, T., Hunter, S., Drew, R., Okutsu, T., Sakamoto, T., and Yoshizaki, G. (2011). Non-sex specific genes associated with the secondary mitotic period of primordial germ cell proliferation in the gonads of embryonic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Reprod. Dev.* 78, 181–187.

Nakagawa, T., Nabeshima, Y.-I., and Yoshida, S. (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev. Cell* 12, 195–206.

Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R.E., and Yoshida, S. (2010). Functional Hierarchy and Reversibility Within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. *Science* 328, 62–67.

Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S., and Tanaka, M. (2010). Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science* 328, 1561–1563.

Nakayama, Y., Yamamoto, T., and Abé, S.I. (1999). IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 343–347.

Naughton, C.K., Jain, S., Strickland, A.M., Gupta, A., and Milbrandt, J. (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol. Reprod.* 74, 314–321.

Naveiras, O., and Daley, G.Q. (2006). Stem cells and their niche: a matter of fate. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 760–766.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379–391.

Nóbrega, R.H., Greebe, C.D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L.R., and Schulz, R.W. (2010). Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. *PLoS ONE* 5, e12808.



- O'Connor, M.D., Kardel, M.D., Iosfina, I., Youssef, D., Lu, M., Li, M.M., Vercauteren, S., Nagy, A., and Eaves, C.J. (2008). Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1109–1116.
- Oatley, J.M., and Brinster, R.L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 263–286.
- Oatley, J.M., Avarbock, M.R., Telaranta, A.I., Fearon, D.T., and Brinster, R.L. (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9524–9529.
- Oatley, J.M., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 25842–25851.
- Oatley, J.M., Oatley, M.J., Avarbock, M.R., Tobias, J.W., and Brinster, R.L. (2009). Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Dev. Camb. Engl.* 136, 1191–1199.
- Oatley, J.M., Kaucher, A.V., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2010). Regulation of mouse spermatogonial stem cell differentiation by STAT3 signaling. *Biol. Reprod.* 83, 427–433.
- Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Racicot, K.E., and Oatley, J.M. (2011). Inhibitor of DNA Binding 4 Is Expressed Selectively by Single Spermatogonia in the Male Germline and Regulates the Self-Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Mice. *Biol. Reprod.* 85, 347–356.
- Ohbo, K., Yoshida, S., Ohmura, M., Ohneda, O., Ogawa, T., Tsuchiya, H., Kuwana, T., Kehler, J., Abe, K., Schöler, H.R., et al. (2003). Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Dev. Biol.* 258, 209–225.
- Ohmura, M., Yoshida, S., Ide, Y., Nagamatsu, G., Suda, T., and Ohbo, K. (2004). Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-4/EGFP transgenic mice. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 285–296.
- Ohno, S., Wolf, U., and Atkin, N.B. (1968). Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* 59, 169–187.
- Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K., and Nishimune, Y. (2000). Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2125–2131.
- Ohta, H., Tohda, A., and Nishimune, Y. (2003). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in the w/wv mutant mouse testis. *Biol. Reprod.* 69, 1815–1821.
- Oka, M., Tagoku, K., Russell, T.L., Nakano, Y., Hamazaki, T., Meyer, E.M., Yokota, T., and Terada, N. (2002). CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 1274–1281.
- Okamura, D., Kimura, T., Nakano, T., and Matsui, Y. (2003). Cadherin-mediated cell interaction regulates germ cell determination in mice. *Dev. Camb. Engl.* 130, 6423–6430.



---

Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2006). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2725–2729.

Oritani, K., Wu, X., Medina, K., Hudson, J., Miyake, K., Gimble, J.M., Burstein, S.A., and Kincade, P.W. (1996). Antibody ligation of CD9 modifies production of myeloid cells in long-term cultures. *Blood* *87*, 2252–2261.

Orr-Urtreger, A., Avivi, A., Zimmer, Y., Givol, D., Yarden, Y., and Lonai, P. (1990). Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the *W* locus. *Dev. Camb. Engl.* *109*, 911–923.

Orth, J.M., Gunsalus, G.L., and Lamperti, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* *122*, 787–794.

Orth, J.M., Qiu, J., Jester, W.F., Jr, and Pilder, S. (1997). Expression of the c-kit gene is critical for migration of neonatal rat gonocytes in vitro. *Biol. Reprod.* *57*, 676–683.

Orth, J.M., Jester, W.F., Li, L.H., and Laslett, A.L. (2000). Gonocyte-Sertoli cell interactions during development of the neonatal rodent testis. *Curr. Top. Dev. Biol.* *50*, 103–124.

Oulad-Abdelghani, M. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J. Cell Biol.* *135*, 469–477.

Ozaki, Y., Saito, K., Shinya, M., Kawasaki, T., and Sakai, N. (2011). Evaluation of *Sycp3*, *Plzf* and *Cyclin B3* expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish. *Gene Expr. Patterns GEP* *11*, 309–315.

## - P -

Pacchiarotti, J., Maki, C., Ramos, T., Marh, J., Howerton, K., Wong, J., Pham, J., Anorve, S., Chow, Y.-C., and Izadyar, F. (2010). Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differ. Res. Biol. Divers.* *79*, 159–170.

Pain, B., Clark, M.E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., and Etches, R.J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 2339–2348.

Papaioannou, M.D., and Nef, S. (2010). microRNAs in the testis: building up male fertility. *J. Androl.* *31*, 26–33.

Papayannopoulou, T. (2003). Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles. *Curr. Opin. Hematol.* *10*, 214–219.

Parichy, D.M., Rawls, J.F., Pratt, S.J., Whitfield, T.T., and Johnson, S.L. (1999). Zebrafish sparse corresponds to an orthologue of c-kit and is required for the morphogenesis of a subpopulation of melanocytes, but is not essential for hematopoiesis or primordial germ cell development. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 3425–3436.

Parichy, D.M., Ransom, D.G., Paw, B., Zon, L.I., and Johnson, S.L. (2000). An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 3031–3044.

Park, J.K., Liu, X., Strauss, T.J., McKearin, D.M., and Liu, Q. (2007). The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells. *Curr. Biol. CB* *17*, 533–538.



---

Pascual, A., Hidalgo-Figueroa, M., Gómez-Díaz, R., and López-Barneo, J. (2011). GDNF and protection of adult central catecholaminergic neurons. *J. Mol. Endocrinol.* *46*, R83–92.

Payer, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Barton, S.C., Lee, C., Saitou, M., and Surani, M.A. (2006). Generation of stella-GFP transgenic mice: a novel tool to study germ cell development. *Genes. N. Y. N* *2000* *44*, 75–83.

Potten, C.S., and Hendry, J.H. (1975). Differential regeneration of intestinal proliferative cells and cryptogenic cells after irradiation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* *27*, 413–424.

Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Dev. Camb. Engl.* *110*, 1001–1020.

Prabhu, S.M., Meistrich, M.L., McLaughlin, E.A., Roman, S.D., Warne, S., Mendis, S., Itman, C., and Loveland, K.L. (2006). Expression of c-Kit receptor mRNA and protein in the developing, adult and irradiated rodent testis. *Reprod. Camb. Engl.* *131*, 489–499.

### - R -

Reid, A., Gould, A., Brand, N., Cook, M., Strutt, P., Li, J., Licht, J., Waxman, S., Krumlauf, R., and Zelent, A. (1995). Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* *86*, 4544–4552.

Reiss, D., Josse, T., Anxolabéhère, D., and Ronsseray, S. (2004). aubergine mutations in *Drosophila melanogaster* impair P cytotype determination by telomeric P elements inserted in heterochromatin. *Mol. Genet. Genomics MGG* *272*, 336–343.

Resnick, J.L., Bixler, L.S., Cheng, L., and Donovan, P.J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* *359*, 550–551.

Richards, A.J., Enders, G.C., and Resnick, J.L. (1999). Differentiation of murine premitotic primordial germ cells in culture. *Biol. Reprod.* *61*, 1146–1151.

Richardson, B.E., and Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 37–49.

Rodriguez-Sosa, J.R., Dobson, H., and Hahnel, A. (2006). Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology* *66*, 2091–2103.

Rolland, A.D., Lardenois, A., Goupil, A.-S., Lareyre, J.-J., Houlgatte, R., Chalmel, F., and Le Gac, F. (2013). Profiling of androgen response in rainbow trout pubertal testis: relevance to male gonad development and spermatogenesis. *PloS One* *8*, e53302.

De Rooij, D.G. (1998). Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Pathol.* *79*, 67–80.

De Rooij, D.G., and Grootegoed, J.A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 694–701.

Rossi, P., Lolicato, F., Grimaldi, P., Dolci, S., Di Sauro, A., Filipponi, D., and Geremia, R. (2008). Transcriptome analysis of differentiating spermatogonia stimulated with kit ligand. *Gene Expr. Patterns GEP* *8*, 58–70.

Rothschild, G., Sottas, C.M., Kissel, H., Agosti, V., Manova, K., Hardy, M.P., and Besmer, P. (2003). A role for kit receptor signaling in Leydig cell steroidogenesis. *Biol. Reprod.* *69*, 925–932.



---

Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., and Wylie, C. (2006). Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 133, 4861–4869.

Russell, L.D., Alger, L.E., and Nequin, L.G. (1987). Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology* 120, 1615–1632.

Ryu, B.-Y., Orwig, K.E., Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2004). Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Dev. Biol.* 274, 158–170.

Ryu, B.-Y., Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2005). Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14302–14307.

**- S -**

Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H., and Saga, Y. (2009). The RNA-Binding Protein NANOS2 Is Required to Maintain Murine Spermatogonial Stem Cells. *Science* 325, 1394–1398.

Saffman, E.E., and Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 55, 1141–1163.

Saga, Y. (2008). Sexual development of mouse germ cells: Nanos2 promotes the male germ cell fate by suppressing the female pathway. *Dev. Growth Differ.* 50, S141–S147.

Sairam, M.R., and Krishnamurthy, H. (2001). The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models. *Arch. Med. Res.* 32, 601–608.

Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., and Yamaha, E. (2008). Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* 78, 159–166.

Saitou, M., Barton, S.C., and Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418, 293–300.

Sakaki-Yumoto, M., Kobayashi, C., Sato, A., Fujimura, S., Matsumoto, Y., Takasato, M., Kodama, T., Aburatani, H., Asashima, M., Yoshida, N., et al. (2006). The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3005–3013.

Sánchez-Sánchez, A.V., Camp, E., García-España, A., Leal-Tassias, A., and Mullor, J.L. (2010). Medaka Oct4 is expressed during early embryo development, and in primordial germ cells and adult gonads. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 672–679.

Santos Nassif Lacerda, S.M., Costa, G.M.J., da Silva, M. de A., Almeida Campos-Junior, P.H., Segatelli, T.M., Peixoto, M.T.D., Resende, R.R., and de França, L.R. (2013). Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 95–106.

Sarot, E., Payen-Groschêne, G., Bucheton, A., and Péliisson, A. (2004). Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene. *Genetics* 166, 1313–1321.



- 
- Savitsky, M., Kwon, D., Georgiev, P., Kalmykova, A., and Gvozdev, V. (2006). Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline. *Genes Dev.* *20*, 345–354.
- Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2007). A novel transforming growth factor-beta superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Biol.* *301*, 266–275.
- Schisa, J.A. (2012). New insights into the regulation of RNP granule assembly in oocytes. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *295*, 233–289.
- Schlatt, S., Foppiani, L., Rolf, C., Weinbauer, G.F., and Nieschlag, E. (2002). Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 55–62.
- Schlessner, H.N., Simon, L., Hofmann, M.-C., Murphy, K.M., Murphy, T., Hess, R.A., and Cooke, P.S. (2008). Effects of ETV5 (ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice. *Biol. Reprod.* *78*, 483–489.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7–25.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.-J., Le Gac, F., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., and Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* *165*, 390–411.
- Schuster, K., Dambly-Chaudière, C., and Ghysen, A. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor defines the path of developing and regenerating axons in the lateral line system of zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 19531–19536.
- Seandel, M., James, D., Shmelkov, S.V., Falciatori, I., Kim, J., Chavala, S., Scherr, D.S., Zhang, F., Torres, R., Gale, N.W., et al. (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* *449*, 346–350.
- Seydoux, G., and Braun, R.E. (2006). Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell* *127*, 891–904.
- Shawlot, W., and Behringer, R.R. (1995). Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* *374*, 425–430.
- Sheng, X.R., and Matunis, E. (2011). Live imaging of the *Drosophila* spermatogonial stem cell niche reveals novel mechanisms regulating germline stem cell output. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3367–3376.
- Shetty, J., Marathe, G.K., and Dighe, R.R. (1996). Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* *137*, 2179–2182.
- Shinohara, T., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (1999). beta(1)- and alpha(6)-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 5504–5509.
- Shinohara, T., Orwig, K.E., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2000a). Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 8346–8351.
- Shinohara, T., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2000b). Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models. *Dev. Biol.* *220*, 401–411.



- 
- Shinohara, T., Orwig, K.E., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2002). Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes. *Biol. Reprod.* *66*, 1491–1497.
- Shinohara, T., Ishii, K., and Kanatsu-Shinohara, M. (2011). Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro. *J. Reprod. Dev.* *57*, 288–295.
- Siegfried, K.R. (2010). In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *J. Fish Biol.* *76*, 1879–1902.
- Silva, R.C., Costa, G.M.J., Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R., Soares, J.M., Avelar, G.F., Böttger, K.B., Silva, S.F., Jr, Nogueira, M.S., Andrade, L.M., et al. (2012). Germ cell transplantation in felids: a potential approach to preserving endangered species. *J. Androl.* *33*, 264–276.
- Simon, L., Ekman, G.C., Tyagi, G., Hess, R.A., Murphy, K.M., and Cooke, P.S. (2007). Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp. Cell Res.* *313*, 3090–3099.
- Simorangkir, D.R., Marshall, G.R., and Plant, T.M. (2009). A re-examination of proliferation and differentiation of type A spermatogonia in the adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *24*, 1596–1604.
- Singh, J., and Handelsman, D.J. (1996). Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *J. Endocrinol.* *151*, 37–48.
- Singh, J., O’Neill, C., and Handelsman, D.J. (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* *136*, 5311–5321.
- Smith, L.D. (1966). The role of a “germinal plasm” in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens*. *Dev. Biol.* *14*, 330–347.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* *336*, 688–690.
- Song, M., and Gutzeit, H.O. (2003). Effect of 17-alpha-ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. *Dev. Growth Differ.* *45*, 327–337.
- Song, X., Zhu, C.-H., Doan, C., and Xie, T. (2002). Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science* *296*, 1855–1857.
- Sonoda, J., and Wharton, R.P. (1999). Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes Dev.* *13*, 2704–2712.
- Sourdaine, P., and Jégou, B. (1993). Cell-cell interactions in the testis of the dogfish: stage-related changes in protein synthesis. *Fish Physiol. Biochem.* *11*, 299–309.
- Spinnler, K., Köhn, F.M., Schwarzer, U., and Mayerhofer, A. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *25*, 2181–2187.
- Spradling, A., Fuller, M.T., Braun, R.E., and Yoshida, S. (2011). Germline stem cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a002642.
- Stewart, F.M., Crittenden, R.B., Lowry, P.A., Pearson-White, S., and Quesenberry, P.J. (1993). Long-term engraftment of normal and post-5-fluorouracil murine marrow into normal nonmyeloablated mice. *Blood* *81*, 2566–2571.



---

Strome, S., and Lehmann, R. (2007). Germ Versus Soma Decisions: Lessons from Flies and Worms. *Science* 316, 392–393.

Suzuki, A., Tsuda, M., and Saga, Y. (2007). Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. *Development* 134, 77–83.

Suzuki, A., Igarashi, K., Aisaki, K., Kanno, J., and Saga, Y. (2010). NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3594–3599.

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

Suzuki, H., Ahn, H.W., Chu, T., Bowden, W., Gassei, K., Orwig, K., and Rajkovic, A. (2012). SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. *Dev. Biol.* 361, 301–312.

**- T -**

Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., and Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech. Dev.* 113, 29–39.

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

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

Tajima, Y., Watanabe, D., Koshimizu, U., Matsuzawa, T., and Nishimune, Y. (1995). Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. *Int. J. Androl.* 18, 8–12.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2003). Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 69, 1142–1149.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004). Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430, 629–630.

Tansey, M.G., Baloh, R.H., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr (2000). GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 25, 611–623.

Tapanainen, J.S., Tilly, J.L., Vihko, K.K., and Hsueh, A.J. (1993). Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 7, 643–650.

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455, 1124–1128.

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



---

Terstappen, L.W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P.M., and Loken, M.R. (1991). Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38-progenitor cells. *Blood* 77, 1218–1227.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.

Thorgaard, G.H. (1977). Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. *Science* 196, 900–902.

TILL, J.E., and McCULLOCH, E.A. (1963). Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo. *Radiat. Res.* 18, 96–105.

Toebosch, A.M., Robertson, D.M., Trapman, J., Klaassen, P., de Paus, R.A., de Jong, F.H., and Grootegoed, J.A. (1988). Effects of FSH and IGF-I on immature rat Sertoli cells: inhibin alpha- and beta-subunit mRNA levels and inhibin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 55, 101–105.

Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., and Marunouchi, T. (2007). CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol. Reprod.* 76, 130–141.

Toyoda, S., Miyazaki, T., Miyazaki, S., Yoshimura, T., Yamamoto, M., Tashiro, F., Yamato, E., and Miyazaki, J. (2009). *Sohlh2* affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. *Dev. Biol.* 325, 238–248.

Trefil, P., Bakst, M.R., Yan, H., Hejnar, J., Kalina, J., and Mucksová, J. (2010). Restoration of spermatogenesis after transplantation of c-Kit positive testicular cells in the fowl. *Theriogenology* 74, 1670–1676.

Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., and Saga, Y. (2003). Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science* 301, 1239–1241.

Tulina, N., and Matunis, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* 294, 2546–2549.

Tushinski, R.J., Oliver, I.T., Guilbert, L.J., Tynan, P.W., Warner, J.R., and Stanley, E.R. (1982). Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell* 28, 71–81.

- U -

Unni, E., Rao, M.R., and Ganguly, J. (1983). Histological & ultrastructural studies on the effect of vitamin A depletion & subsequent repletion with vitamin A on germ cells & Sertoli cells in rat testis. *Indian J. Exp. Biol.* 21, 180–192.

Urven, L.E., Erickson, C.A., Abbott, U.K., and McCarrey, J.R. (1988). Analysis of germ line development in the chick embryo using an anti-mouse EC cell antibody. *Dev. Camb. Engl.* 103, 299–304.

- V -

VERMANDE-VAN ECK, G.J. (1956). Neo-ovogenesis in the adult monkey; consequences of atresia of oocytes. *Anat. Rec.* 125, 207–224.



---

Viñas, J., and Piferrer, F. (2008). Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. *Biol. Reprod.* *79*, 738–747.

Vincent, S., Segretain, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S.I., Sage, J., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (1998). Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 4585–4593.

Volff, J.-N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* *94*, 280–294.

Voronina, E., Seydoux, G., Sassone-Corsi, P., and Nagamori, I. (2011). RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.

**- W -**

Wang, Z., and Lin, H. (2004). Nanos Maintains Germline Stem Cell Self-Renewal by Preventing Differentiation. *Science* *303*, 2016–2019.

Warren, M.K., and Ralph, P. (1986). Macrophage growth factor CSF-1 stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *137*, 2281–2285.

Watt, F.M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* *21*, 3919–3926.

Webb, S.E., and Miller, A.L. (2013). Ca<sup>2+</sup> signaling during activation and fertilization in the eggs of teleost fish. *Cell Calcium* *53*, 24–31.

Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2003). dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol. CB* *13*, 1429–1434.

Weismann, A., and de Varigny, H.C. (1892). *Essais sur l'hérédité et la sélection naturelle* (C. Reinwald).

White, Y.A.R., Woods, D.C., and Wood, A.W. (2011). A transgenic zebrafish model of targeted oocyte ablation and de novo oogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *240*, 1929–1937.

White, Y.A.R., Woods, D.C., Takai, Y., Ishihara, O., Seki, H., and Tilly, J.L. (2012). Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat. Med.* *18*, 413–421.

White-Cooper, H., and Bausek, N. (2010). Evolution and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *365*, 1465–1480.

Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684–687.

Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 93–106.

Wong, T.-T., and Collodi, P. (2013). Effects of specific and prolonged expression of zebrafish growth factors, *Fgf2* and *Lif* in primordial germ cells in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *430*, 347–351.



---

Woods, D.C., and Tilly, J.L. (2013). An evolutionary perspective on adult female germline stem cell function from flies to humans. *Semin. Reprod. Med.* 31, 24–32.

Wu, J.C., Gregory, C.W., and DePhilip, R.M. (1993). Expression of E-cadherin in immature rat and mouse testis and in rat Sertoli cell cultures. *Biol. Reprod.* 49, 1353–1361.

Wu, Q., Chen, X., Zhang, J., Loh, Y.-H., Low, T.-Y., Zhang, W., Zhang, W., Sze, S.-K., Lim, B., and Ng, H.-H. (2006). Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 281, 24090–24094.

Wu, X., Oatley, J.M., Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2010). The POU Domain Transcription Factor POU3F1 Is an Important Intrinsic Regulator of GDNF-Induced Survival and Self-Renewal of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Biol. Reprod.* 82, 1103–1111.

Wu, X., Goodyear, S.M., Tobias, J.W., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2011). Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Requires ETV5-Mediated Downstream Activation of Brachyury in Mice. *Biol. Reprod.* 85, 1114–1123.

**- X -**

Xie, T., and Spradling, A.C. (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 290, 328–330.

Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A., and Kosik, K.S. (2009). MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 137, 647–658.

**- Y -**

Yamashita, Y.M., and Fuller, M.T. (2005). Asymmetric stem cell division and function of the niche in the *Drosophila* male germ line. *Int. J. Hematol.* 82, 377–380.

Yamashita, Y.M., Jones, D.L., and Fuller, M.T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 301, 1547–1550.

Yan, W., Suominen, J., and Toppari, J. (2000). Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 1), 161–168.

Yang, H.-S., Alexander, K., Santiago, P., and Hinds, P.W. (2003). ERM proteins and Cdk5 in cellular senescence. *Cell Cycle Georget. Tex* 2, 517–520.

Yang, J., Chai, L., Fowles, T.C., Alipio, Z., Xu, D., Fink, L.M., Ward, D.C., and Ma, Y. (2008). Genome-wide analysis reveals Sall4 to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19756–19761.

Yano, A., von Schalburg, K., Cooper, G., Koop, B.F., and Yoshizaki, G. (2009). Identification of a molecular marker for type A spermatogonia by microarray analysis using gonadal cells from pvasa-GFP transgenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Reprod. Dev.* 76, 246–254.

Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., and Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr. Biol. CB* 22, 1423–1428.



---

Yao, K., and Ge, W. (2010). Kit system in the zebrafish ovary: evidence for functional divergence of two isoforms of kit (kita and kitb) and kit ligand (kitlga and kitlgb) during folliculogenesis. *Biol. Reprod.* *82*, 1216–1226.

Yoon, C., Kawakami, K., and Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 3157–3165.

Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T., and Nabeshima, Y.-I. (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev. Biol.* *269*, 447–458.

Yoshida, S., Nabeshima, Y.-I., and Nakagawa, T. (2007). Stem cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1120*, 47–58.

Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Sakatani, S., and Takeuchi, T. (2000). Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *Int. J. Dev. Biol.* *44*, 323–326.

Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Ihara, S., and Takeuchi, T. (2002). Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. *Fish Physiol. Biochem.* *26*, 3–12.

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

Youngren, K.K., Coveney, D., Peng, X., Bhattacharya, C., Schmidt, L.S., Nickerson, M.L., Lamb, B.T., Deng, J.M., Behringer, R.R., Capel, B., et al. (2005). The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* *435*, 360–364.

Yuri, S., Fujimura, S., Nimura, K., Takeda, N., Toyooka, Y., Fujimura, Y.-I., Aburatani, H., Ura, K., Koseki, H., Niwa, H., et al. (2009). Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency, of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 796–805.

## - Z -

Zhang, J., Tam, W.-L., Tong, G.Q., Wu, Q., Chan, H.-Y., Soh, B.-S., Lou, Y., Yang, J., Ma, Y., Chai, L., et al. (2006). Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1114–1123.

Zheng, K., Wu, X., Kaestner, K.H., and Wang, P.J. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev. Biol.* *9*, 38.

Zhou, Y., and King, M.L. (2004). Sending RNAs into the future: RNA localization and germ cell fate. *IUBMB Life* *56*, 19–27.

Zhou, Q., Li, Y., Nie, R., Friel, P., Mitchell, D., Evanoff, R.M., Pouchnik, D., Banasik, B., McCarrey, J.R., Small, C., et al. (2008). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol. Reprod.* *78*, 537–545.

Zhou, S., Morris, J.J., Barnes, Y., Lan, L., Schuetz, J.D., and Sorrentino, B.P. (2002). Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 12339–12344.



---

Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., et al. (2009). Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat. Cell Biol.* *11*, 631–636.



---

## Annexe 1

### Valorisation des résultats

#### Publications

- “Spermatogonial stem cell quest; *nanos2*, marker of a sub-population of undifferentiated A spermatogonia in trout”  
Soumis à Biology of Reproduction, accepté avec modification mineur
- “Fsh regulates *gdnf* and *gfra1* expression in the fish testis”  
Prêt pour une soumission à Biology of Reproduction

#### Participation à des congrès internationaux

- **17<sup>th</sup> European Testis Workshop** (Mini-Poster et Communication courte à l’oral)  
20 au 24 Avril 2012; Stockholm, Suède  
“*Conserved molecular markers of spermatogonial stem cells in the rainbow trout testis*”
- **GRC : Germinal Stem Cell Biology** (Poster)  
14 au 19 juillet 2013; Hong Kong  
(Financé par l’obtention d’une bourse Dufrenoy)  
“*Identification of a spermatogonial stem cell population in the fish testis*”
- **Society for the Study of Reproduction's 46th Annual Meeting** (Communication orale)  
22 au 26 juillet 2013; Montréal, Canada  
(Financé en partie par l’obtention d’une bourse Region Bretagne)  
“*Spermatogonial Stem Cells in fish testis: morphological aspects, molecular markers and functional study*”

#### Co-encadrement

- **Naoual Bennouioua**  
Stagiaire Master 2 – 6 mois (janvier - juin 2012)  
« *Caractérisation de marqueurs de cellules souches germinales dans le testicule de truite* »
- **Léa Clusan**  
Stagiaire IUT – 2 mois (avril – mai 2012)  
« *Transfert de cellules germinales souches dans l’embryon de truite : méthode pour vérifier la colonisation de la gonade* »
- **Zuzanna Linhartova**  
Doctorante première année de République Tchèque – 3 mois (février – avril 2013)  
« *Injection de cellules souches spermatogoniales dans des œufs non fécondés de truite arc-en-ciel ; test de la pluripotence* »



## Mini-poster présenté au 17<sup>th</sup> European Testis Workshop

### IDENTIFICATION DE MARQUEURS DE CELLULES SPERMATOGONIALES SOUCHES CHEZ LA TRUITE ARC EN CIEL



J. Bellaïche, D. Mahé +, N. Benouioua, A. Goupil, J.-J. Lareyre, I. Allemand \* and F. Le Gac  
 INRA, UR1037 LPGP, PTP – Biosit - Campus de Beaulieu F-35042 Rennes France  
 (+) INSERM, U1035 Campus de Beaulieu F-35042 Rennes France  
 (\*) INSERM, U967 IRCM – F-92265 Fontenay aux Roses France

#### Introduction:

Les cellules spermatogoniales souches sont le support de la spermatogénèse et permettent la production du nombre considérable de spermatozoïdes. Identifier ces cellules et comprendre leur voies de régulations (proliférations vs différenciation) représente un enjeu majeur afin de développer des outils biotechnologiques notamment pour mieux contrôler les système d'élevage piscicole. En dépit d'un intérêt fort pour l'étude de la biologie des cellules souches chez les mammifères (animaux modèles et d'élevage), peu d'études ont été menées sur ce sujet dans les espèces de vertébrés inférieurs. Après avoir identifiés in silico les orthologues et paralogues de marqueurs de SSC connus chez la souris dans notre espèce modèle, la truite arc en ciel, nous avons suivi leur profil d'expression dans le testicule. Trois gènes candidats ont été ainsi sélectionnés : *plzf*, *gfra1*<sup>2</sup> and *c-kit*<sup>3</sup>.

#### Matériels et méthodes:

Des testicules d'animaux immatures ont été disséqués, puis  
 - utilisés pour l'extraction d'ARNs  
 - fixés dans du PAF 4% froid pour les IHC  
 - digérés par de la collagénase pendant 6h, puis soumis à l'éutriation centrifuge afin d'isoler les spermatogonies A.  
 Les profils d'expression de *plzf*, *gfra1* et *c-kit* ont été ensuite suivi par RT-qPCR, immunohistochimie-cytochimie et cytomètre en flux.

#### Résultats:

Les gènes candidats préalablement identifiés grâce à une recherche in silico sont tous exprimés dans le testicule à l'exception d'un duplicat de *gfra1* présent uniquement chez les téléostéens, *gfra1b*. En utilisant des anticorps hétérologues (souris), nous avons observé l'expression de *plzf* (tissu), *gfra1a*, et *c-kit* (cytopspin) dans une sous-population de spermatogonie A de testicule immature. Des expériences de cytomètre en flux ont aussi été réalisées pour confirmer et affiner ces résultats. Environ 8% des spermatogonies isolées sont positives pour *gfra1*. Cependant, aucuns résultats concluants n'ont pu être obtenus pour les autres gènes.

Gene	<i>plzfa</i>	<i>plzfb</i>	<i>gfra1a</i>	<i>gfra1b</i>	<i>c-kit</i>
Testis exp	yes	yes	yes	no	yes

Figure 1. Expression des gènes dans le testicule immature (qRT-PCR)

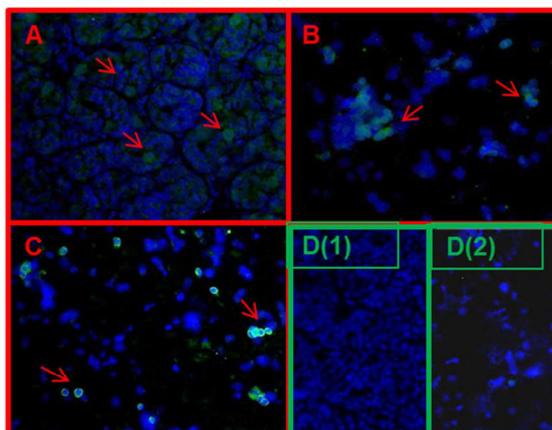


Figure 2. Immunohistochimie avec des anticorps souris dans le testicule de poisson

A. Plzf sur coupe de testicule (5µm), B. Gfra1 sur cellules cytopsinées, C. C-kit sur cellules cytopsinées, D-(1). Contrôle sur coupe de testicule, D-(2) Contrôle sur cellules cytopsinées.

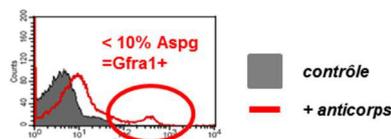


Figure 3. Expression de Gfra1 expression dans des spermatogonies isolées de testicule immature, par cytomètre en flux avec un anticorps anti-gfra1.

#### Conclusions et perspectives:

La localisation de l'expression de *plzf*, *gfra1* et *c-kit* dans des grosses cellules germinales isolées est en accord avec un rôle conservé des gènes comme marqueurs de spermatogonies souches chez la truite. De plus, nous avons aussi identifié l'expression dans le testicule de deux facteurs importants impliqués dans la régulation des spermatogonies souches : *gdnf* et *kit ligand*, qui interagissent respectivement avec *gfra1* et *c-kit*. D'autres expériences sont actuellement réalisées pour suivre l'expression spatio-temporelle de ces gènes au cours du développement testiculaire et en particulier en fin de cycle, lorsque n'est présents dans les tubules que des spermatozoïdes et de grosses spermatogonies isolées nécessaire pour initier une seconde vague de spermatogénèse.

#### References :

- Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, Mclean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE 2004 Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal.
- Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J 2006 Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate (vol 74, pg 314, 2006).
- Ohta H, Yomogida K, Dohmae K, Nishimune Y 2000 Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF.





# Poster présenté à la GRC : Germinal Stem Cell Biology



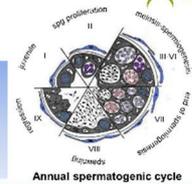
## IDENTIFICATION OF A SPERMATOGONIAL STEM CELL POPULATION IN THE FISH TESTIS



Johanna Bellaïche, Anne-Sophie Goupil, Chantal Cauty, Jean-Jacques Lareyre, Florence Le Gac.  
 johanna.bellaïche@rennes.inra.fr  
 INRA-National Institute of Agronomic Research, Fish Physiology and Genomic Laboratory, Beaulieu campus, 35042 Rennes, France.

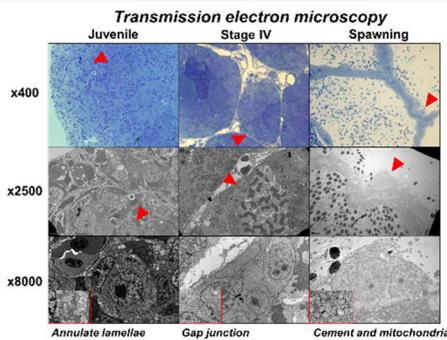
Spermatogenesis Stem Cells (SSCs) have yet to be identified in fish. The present study was aimed at characterizing SSCs in rainbow trout testis using morphological and molecular approaches.

In rainbow trout, spermatogenesis progresses in cysts containing clonal germ cells and testis maturation is governed by seasonality (see annual cycle representation on the right). Interestingly, at the spawning stage, only SSCs - needed for the following wave of spermatogenesis- and spermatozoa are present in the testis.



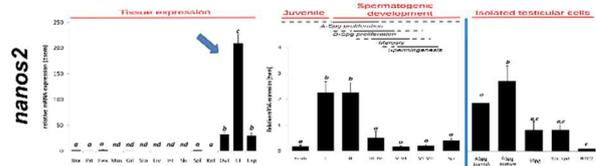
### SSCs morphological identification

In all stages of testis maturation, we identified isolated or paired of undifferentiated spermatogonia with morphological characteristics of SSC, surrounded by 1-2 Sertoli cells.

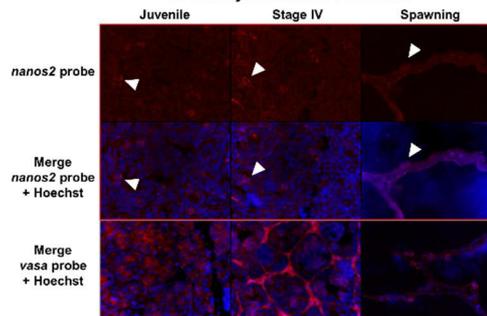


### nanos2, marker of a subset of A-spermatogonia

nanos2 is specifically expressed in the gonads. Its transcript is localized in a subset of undifferentiated A-spermatogonia, isolated or by pair, even at the spawning stage.

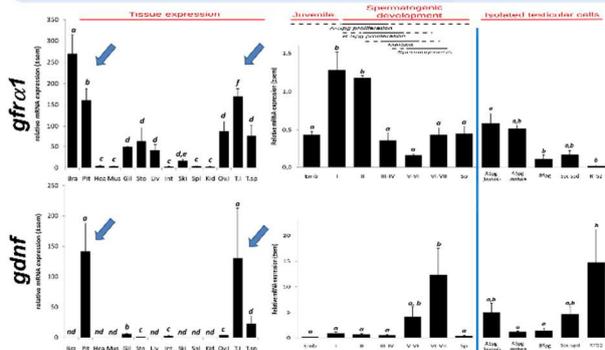


### In situ Hybridization of nanos2



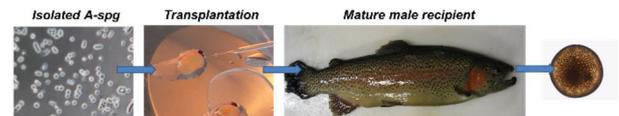
### gdnf-gfra1 pathway is conserved in fish

gfra1 and gdnf are expressed in CNS and testis. gfra1 is highest in undifferentiated spermatogonia while gdnf is mostly associated to the somatic component of the testis (RTG2 = rainbow trout testis somatic cell line).



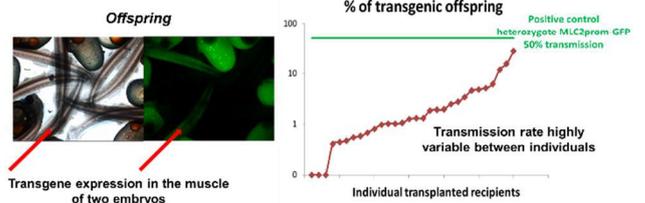
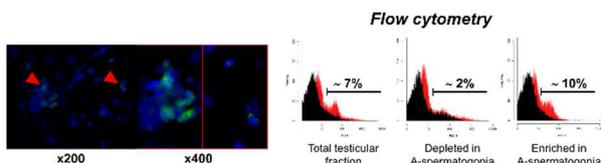
### Functional characterization

Transplantation of mlc2prom-GFP A-spermatogonia into pre-hatching embryos leads to gonad colonization and to a high rate of transgene transmission to the offspring. (>85% of the transplanted males produce transgenic spermatozoa)



### Anti-gfra1 labels a subset of A-spermatogonia

The staining is concentrated at the cell membrane in some A-spermatogonia (~10%). It could allow to sort a population of potential trout SSCs.



In juvenile and adult trout testis, a subset of isolated or paired undifferentiated spermatogonia presents SSC characteristics.

We propose that nanos2 labeled cells in maturing and in regressed testis are the SSCs and that the GDNF/GFR $\alpha$ 1 pathway is involved in undifferentiated germ cell fate in teleosts.

We gratefully thank the Agricultural Academy of France for their Dufrenoy's grant.



---

## Annexe 4

### **Abstract de la communication orale au 46th Annual Meeting de la SSR**

#### **Identifying the spermatogonial stem cells in fish testis: morphological aspects, molecular markers and functional study.**

Johanna Bellaïche, Anne-Sophie Goupil, Jean-Jacques Lareyre, Florence Le Gac.

INRA-National Institute of Agronomic Research, Fish Physiology and Genomic Laboratory, Beaulieu campus, 35042 Rennes, France.

Continuous production of spermatozoa throughout life in adult male vertebrate is dependent of the self renewal and differentiation of a sub-population of A-spermatogonia named spermatogonial stem cells (SSCs). Several molecular markers have been proposed to identify and/or purify the SCCs in mammalian species but such information remains scarce in fish. The present study was aimed at identifying SSCs in rainbow trout testis using morphological and molecular approaches. The capacity of adult testicular cells to colonize recipient testis and resume spermatogenesis was also tested. Using high-resolution light microscopy, we identified large and isolated spermatogonia with ultrastructural characteristics of germinal stem cells; electron-dense perinuclear granules, numerous round mitochondria, a large nucleus with one nucleolus and few heterochromatin. In the adult testis we also observed frequently paired of spermatogonia surrounded by Sertoli cells with the same characteristics. These cells may be the counterpart of the undifferentiated A-paired spermatogonia in mouse. Moreover, scarce spermatogonia present in the spermiating testis showed no heterochromatin in the nucleus, sign of few transcriptional activity like the quiescent stem cells. After identifying trout homologous genes of mammalian SSC markers, we studied their tissue and cellular expression patterns during the reproductive cycle. We found that *nanos2*, gene implicated in the inhibition of SSCs differentiation, is only expressed in the gonads from immature juveniles to sexually mature adults. In particular, only the isolated and paired spermatogonia showed transcript expression. Moreover, we demonstrated that *gfr $\alpha$ 1*, another well-known SSCs marker, was expressed in the testis in a sub-population of A-spermatogonia (5-6%) by immunocytochemistry and flow-cytometry analysis. Finally, transplantation of a testicular cell fraction collected from immature transgenic fish in wild-type embryos yielded to the production of transgenic offspring indicating the colonization, proliferation and differentiation of transplanted spermatogonial stem cells into functional spermatozoa. This study implicates the conservation of morphological, molecular and functional characteristics of SSCs between two phylogenetically distant vertebrate species (mammals and teleosts).



VU :

**Le Directeur de Thèse**  
(Nom et Prénom)

VU :

**Le Responsable de l'École Doctorale**

**VU pour autorisation de soutenance**

**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELINÉAU**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**

**Le Président de Jury,**  
Charles Pineau



## Résumé

Les cellules souches spermatogoniales (SSCs) constituent la population de cellules germinales initiales support de la production des spermatozoïdes tout le long de la vie d'un individu. Ces cellules caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation maintiennent ainsi une réserve et garantissent la production continue de cellules germinales différenciées. Chez les mammifères, plusieurs marqueurs permettant de reconnaître cette population cellulaire au sein du testicule ont été identifiés. De plus, parmi ces marqueurs, certains permettent d'isoler et de purifier les SSCs. Ils ont ainsi permis d'aborder les mécanismes de régulation du devenir des SSCs par des expériences menées *in vitro* et *in vivo*. En revanche, la biologie de ces cellules est beaucoup moins connue chez les vertébrés non mammaliens, en particulier chez les poissons téléostéens. Notre modèle d'étude, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est caractérisée par une spermatogenèse cyclique et fortement saisonnée. La croissance du testicule immature, la prolifération active des spermatogonies à la puberté, et la quiescence de ces dernières en fin de cycle semblent être des étapes clés de régulation du devenir des SSCs. Grâce à l'analyse des profils d'expression au cours du cycle spermatogénétique et dans des fractions de cellules testiculaires isolées, nous montrons la conservation d'expression de gènes décrits comme marqueurs de SSCs chez les mammifères (*pou2*, *plzf*, *nanos2* et *3*, *gfra1*) dans les populations de spermatogonies A indifférenciées de truite. En particulier, *gfra1* et *nanos2* identifient tous deux une sous-population de cellules au sein des spermatogonies. Nous proposons donc que les cellules *gfra1*<sup>+</sup> et/ou *nanos2*<sup>+</sup> sont des SSCs au sein du testicule de truite. Par ailleurs, nous montrons que l'orthologue truite de *gdnf*, ligand de *gfra1* et régulateur majeur du maintien des SSCs chez la souris, est exprimé très fortement juste avant la fin de cycle spermatogénétique. Cette expression corrélée avec un pic de sécrétion plasmatique de Fsh suggérerait une régulation positive de *gdnf* par cette hormone. Notre étude *in vitro* n'a pas permis d'aboutir aux mêmes conclusions, mais cette technique ne reflète pas toutes les régulations réciproques ni le rôle des autres facteurs *in vivo*. En conclusion, nous avons découvert des marqueurs probables de SSCs chez la truite. En particulier, *gfra1* et *nanos2* qui permettront une analyse plus approfondie de la biologie des SSCs chez les téléostéens. De plus, l'expression de *gdnf* et de son récepteur dans le testicule, régulée en fonction du stade du cycle spermatogénétique, nous permet d'envisager cette voie comme régulateur du devenir des SSCs chez la truite.

**Mot-clés :** *nanos2*, *gfra1*, *gdnf*, truite, spermatogenèse, spermatogonies souches

## Abstract

Spermatozoa production throughout life requires the presence of the initial germ cells, the spermatogonial stem cells (SSCs). Their self-renewal and their ability to differentiate assure to keep a reserve and to produce continuously differentiated germ cell. In mammals, several markers of the SSCs have been identified. Interestingly, some of them allow us to sort the SSCs population and further to analyze their fate *in vitro* and *in vivo*. By contrast, only scarce information has been obtained in non-mammalian vertebrates including the teleost fishes. Our model of study, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), presents a seasonal spermatogenesis. The growth of the immature testes, the active spermatogonial proliferation starting at puberty, and their quiescent state at the end of the cycle represent interesting stages to study the regulation on the SSCs fate. Using various testicular stages and purified testicular cell fractions we show that *pou2*, *plzf*, *nanos2* and *3* and *gfra1*, all expressed by spermatogonial stem cells in mammals, are specifically expressed in the undifferentiated A spermatogonia population. In particular, *gfra1* and *nanos2* are expressed in a sub-population of these cells. Thus, we propose that the *nanos2*<sup>+</sup> and/or *gfra1*<sup>+</sup> cells are SSCs. Furthermore, in our study, *gdnf*, ligand of *gfra1* regulating the SSCs fate in mouse, is highly expressed just before the end of the spermatogenetic cycle. Such expression correlates with Fsh peak of secretion. However a stimulation of *gdnf* expression by Fsh was not observed in our *in vitro* experiments, but this technique doesn't represent reciprocal regulations nor the roles of all factors *in vivo*. To conclude, we discovered potent marker of SSCs in trout. In particular, *gfra1* and *nanos2* will allow us to investigate further the SSCs biology in teleosts. Moreover, *gdnf* and its receptor expression in the testis in a spermatogenetic-dependent way lead us to propose this pathway as a potent regulator of the SSCs fate in trout.

**Keywords:** *nanos2*, *gfra1*, *gdnf*, trout, spermatogenesis, spermatogonial stem cells

## Résumé

Les cellules souches spermatogoniales (SSCs) constituent la population de cellules germinales initiales support de la production des spermatozoïdes tout le long de la vie d'un individu. Ces cellules caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation maintiennent ainsi une réserve et garantissent la production continue de cellules germinales différenciées. Chez les mammifères, plusieurs marqueurs permettant de reconnaître cette population cellulaire au sein du testicule ont été identifiés. De plus, parmi ces marqueurs, certains permettent d'isoler et de purifier les SSCs. Ils ont ainsi permis d'aborder les mécanismes de régulation du devenir des SSCs par des expériences menées *in vitro* et *in vivo*. En revanche, la biologie de ces cellules est beaucoup moins connue chez les vertébrés non mammaliens, en particulier chez les poissons téléostéens. Notre modèle d'étude, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est caractérisée par une spermatogenèse cyclique et fortement saisonnée. La croissance du testicule immature, la prolifération active des spermatogonies à la puberté, et la quiescence de ces dernières en fin de cycle semblent être des étapes clés de régulation du devenir des SSCs. Grâce à l'analyse des profils d'expression au cours du cycle spermatogénétique et dans des fractions de cellules testiculaires isolées, nous montrons la conservation d'expression de gènes décrits comme marqueurs de SSCs chez les mammifères (*pou2*, *plzf*, *nanos2* et *3*, *gfra1*) dans les populations de spermatogonies A indifférenciées de truite. En particulier, *gfra1* et *nanos2* identifient tous deux une sous-population de cellules au sein des spermatogonies. Nous proposons donc que les cellules *gfra1+* et/ou *nanos2+* sont des SSCs au sein du testicule de truite. Par ailleurs, nous montrons que l'orthologue truite de *gnf*, ligand de *gfra1* et régulateur majeur du maintien des SSCs chez la souris, est exprimé très fortement juste avant la fin de cycle spermatogénétique. Cette expression corrélée avec un pic de sécrétion plasmatique de Fsh suggérerait une régulation positive de *gnf* par cette hormone. Notre étude *in vitro* n'a pas permis d'aboutir aux mêmes conclusions, mais cette technique ne reflète pas toutes les régulations réciproques ni le rôle des autres facteurs *in vivo*. En conclusion, nous avons découvert des marqueurs probables de SSCs chez la truite. En particulier, *gfra1* et *nanos2* qui permettront une analyse plus approfondie de la biologie des SSCs chez les téléostéens. De plus, l'expression de *gnf* et de son récepteur dans le testicule, régulée en fonction du stade du cycle spermatogénétique, nous permet d'envisager cette voie comme régulateur du devenir des SSCs chez la truite.

**Mot-clés :** *nanos2*, *gfra1*, *gnf*, truite, spermatogenèse, spermatogonies souches

## Abstract

Spermatozoa production throughout life requires the presence of the initial germ cells, the spermatogonial stem cells (SSCs). Their self-renewal and their ability to differentiate assure to keep a reserve and to produce continuously differentiated germ cell. In mammals, several markers of the SSCs have been identified. Interestingly, some of them allow us to sort the SSCs population and further to analyze their fate *in vitro* and *in vivo*. By contrast, only scarce information has been obtained in non-mammalian vertebrates including the teleost fishes. Our model of study, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), presents a seasonal spermatogenesis. The growth of the immature testes, the active spermatogonial proliferation starting at puberty, and their quiescent state at the end of the cycle represent interesting stages to study the regulation on the SSCs fate. Using various testicular stages and purified testicular cell fractions we show that *pou2*, *plzf*, *nanos2* and *3* and *gfra1*, all expressed by spermatogonial stem cells in mammals, are specifically expressed in the undifferentiated A spermatogonia population. In particular, *gfra1* and *nanos2* are expressed in a sub-population of these cells. Thus, we propose that the *nanos2+* and/or *gfra1+* cells are SSCs. Furthermore, in our study, *gnf*, ligand of *gfra1* regulating the SSCs fate in mouse, is highly expressed just before the end of the spermatogenetic cycle. Such expression correlates with Fsh peak of secretion. However a stimulation of *gnf* expression by Fsh was not observed in our *in vitro* experiments, but this technique doesn't represent reciprocal regulations nor the roles of all factors *in vivo*. To conclude, we discovered potent marker of SSCs in trout. In particular, *gfra1* and *nanos2* will allow us to investigate further the SSCs biology in teleosts. Moreover, *gnf* and its receptor expression in the testis in a spermatogenetic-dependent way lead us to propose this pathway as a potent regulator of the SSCs fate in trout.

**Keywords:** *nanos2*, *gfra1*, *gnf*, trout, spermatogenesis, spermatogonial stem cells