

Identification et caractérisation de petits ARN non codants exprimés dans l'ovaire et potentiellement impliqués dans l'ovogenèse chez le médaka

Stéphanie Gay, Violette Thermes, Sophie Couve, Julien Bobe

▶ **To cite this version:**

Stéphanie Gay, Violette Thermes, Sophie Couve, Julien Bobe. Identification et caractérisation de petits ARN non codants exprimés dans l'ovaire et potentiellement impliqués dans l'ovogenèse chez le médaka. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. hal-03127948

HAL Id: hal-03127948
https://ephe.hal.science/hal-03127948

Submitted on 1 Feb 2021

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

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

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE présenté par

Stéphanie GAY

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Identification et caractérisation de petits ARN non codants exprimés dans l'ovaire et potentiellement impliqués dans l'ovogenèse chez le médaka

Soutenu le 01/12/2020

devant le jury composé de :

Dr. Christelle LASBLEIZ - Président
Dr. Denis TAGU - Rapporteur
Dr. Fabienne LE PROVOST - Examinateur
Dr. Sophie COUVE - Tuteur pédagogique
Dr. Violette THERMES - Tuteur scientifique
Dr. Julien BOBE – Co-tuteur scientifique

Mémoire préparé sous la direction de :
Dr. Violette THERMES
Dr. Julien BOBE

et de :
Dr. Sophie COUVE

Structure d'accueil :
INRAE, Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons
Equipe « Sexe, ovogenèse et comportements »
Campus Beaulieu, Bat 16A
35042 RENNES Cedex

Directeur :
Julien BOBE

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail de diplôme de l'EPHE. Merci à Christelle Lasbleiz d'avoir accepté de présider le jury, à Denis Tagu d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de diplôme de l'EPHE en qualité de rapporteur, ainsi qu'à Fabienne Le-Provost d'avoir accepté d'être mon examinatrice.

Je remercie également Sophie Couvé, ma tutrice pédagogique, d'avoir accepté de m'encadrer. Merci pour ta gentillesse, ton aide et tes conseils lors de nos échanges.

Je remercie sincèrement Violette Thermes. Merci pour le soutien et la confiance que tu m'accordes depuis 10 ans … et oui déjà 10 ans ! Tu m'as soutenue depuis le premier jour où je suis arrivée au laboratoire, avant même que je me lance dans cette aventure. Une aventure que je suis ravie d'avoir partagé avec toi. Merci pour ton encadrement, ta patience, tes encouragements dans les bons moments mais également dans ceux plus difficiles. Merci de m'avoir fait confiance toutes ces années. Ce chapitre ne suffira pas pour te remercier comme je le voudrais…Merci.

Je remercie également Julien Bobe de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette formation. Merci pour ton aide, ton soutien ainsi que ta confiance en moi. Malgré ton emploi du temps bien chargé, tu as toujours pris le temps de m'écouter, de m'expliquer, voir même de me donner des petits cours sur l'analyse de données de RNA-seq. Enfin, merci d'avoir pris le temps de me corriger et m'aider dans mes réflexions tout au long de ce travail. Un grand merci!

Je remercie Jérôme Montfort pour sa patience et son aide à comprendre un langage que je ne connaissais pas ou très peu... la bio-info. Merci d'être toujours prêt à répondre à mes questions lors de mes nombreux passages dans ton bureau ou de mes nombreux appels en visio.

Je remercie Cécile Duret, et plus récemment Guillaume Gourmelen, de prendre soin de mes poissons médaka. Un grand merci à vous pour votre aide au quotidien.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'unité LPGP. Que ça soit dans les équipes ou dans les services communs (les installations expérimentales, les plateaux d'histologie, de transcriptomique, d'imagerie et d'informatique et le secrétariat), je vous remercie pour vos conseils, vos disponibilités ainsi que votre gentillesse.

Je remercie les nombreux étudiants avec qui j'ai travaillé. Peut-être est-ce pour garder un esprit jeune mais j'ai partagé énormément de temps avec plusieurs d'entre vous et c'est toujours aussi difficile de vous voir partir. Merci à Sabrina et Laury pour tous les moments que j'ai passé et que je passe toujours avec vous. Merci également à Vincent, Amine, Ahmed, Maxence, Edouard, Luca et Boudjema … je ne suis pas prête de vous oublier !

Je remercie également les collègues de mes anciens laboratoires qui ont joué un rôle très important dans ma formation scientifique et avec qui j'ai passé de superbes années. Merci à Francis, Henry, Yann, Simon, Yves, Barbara et Béa d'avoir partagé vos connaissances scientifiques et techniques. Enfin une pensée pour toi Elisabetta, avec qui tout a commencé.

Je remercie mes ami(e)s de Rennes qui sont devenus, au fil des années, indispensables pour moi. Merci à Flo, Caro, Viseth, Alex, Chris, Laetitia, Jeff, Emilie, Lolo, Anne et David pour votre soutien et vos encouragements.

Pour finir, je souhaite remercier ma famille. Un grand merci à mes parents qui sont un soutien permanent, et d'autant plus pendant ces trois années qui n'ont pas été de tout repos. Merci également à Gina pour ta présence et ton aide au cours de ces années.
Enfin, un immense merci à toi mon homme. Merci de m'avoir supporté et soutenu tout au long de ce travail. Merci de croire en moi, en mes capacités et en mes choix. Merci de t'être occupé de nos deux trésors pendant cette période car ce n'était pas de tout repos également pour toi. Et les filles, un grand merci à vous pour votre patience pendant ces 3 ans.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION……1

1. La reproduction……..……..……..……..……..…….3

2. Le médaka ……..……..……..……3

2.1 Généralité……..……..……..……..……..…….3

2.2 Poisson modèle pour la biologie de la reproduction……..……..……..…5

3. Contrôle génétique et endocrinien de l'ovogenèse…….……..……11

3.1 Les cellules germinales primordiales…….……..…….....11

3.2 Ovogenèse extra-folliculaire (pré-vitellogenèse précoce)…….……...13

3.3 Activation folliculaire (pré-vitellogenèse tardive)……...…….……14

3.4 Grossissement des follicules (vitellogénèse)…….……...14

3.5 Maturation des ovocytes et ovulation (post-vitellogenèse)…….……15

4. Les ARN non codants…….……..…….……17

4.1 Les microARN…….……..…17

4.2 Les piRNA…….…..……...20

5. Objectif de ce travail……..……..……..25

MATERIELS ET METHODES ……..…29

Elevage des médaka…….……..…29

Génotypage……...…29

Récolte des œufs…….…..…29

Prélèvement des tissus ……..…..…29

Extraction des ARN totaux……..…..…31

Séquençage des petits ARN non codants……..…31

Analyse des données…… ……...…31

RT-PCR quantitative……. …….…..…32

Hybridation *in Situ*……..…..33

Oxydation……..……33

Marquage nucléaire et analyse d'image……...…….34

RESULTATS ……..…….35

PARTIE I : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES ARN NON CODANTS OVARIENS IMPLIQUES DANS L'OVOGENESE…….……...37

1. Vue d'ensemble des petits ARN non codants chez le médaka……..…….....…37

2. Caractérisation des miARN dans l'ovaire du médaka…….39

2.1 Identification des miARN gonadiques et ovariens prédominants…….…….……39

2.2 Expression des miARN gonadiques et ovariens prédominants…….…….41

3. Caractérisation des piARN chez le medaka…….……45

3.1 Expression des piARN chez le médaka……..45

3.2 Les piARN régulateurs de gène……...…...49

4. Discussion…….....…52

4.1 Divergence avec les données de la littérature……..…..52

4.2 Présence de piARN régulateurs chez le médaka ? ……....53

PARTIE II : ETUDE DU ROLE DE MIR-202 DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'OVAIRE CHEZ LE MEDAKA……..……..55

1. Etat de l'art : miR-202……..……..……....55

2. Succès de reproduction considérablement réduit en l'absence de mir-202……..…..57

2.1 Fréquence de ponte……..……..57

2.2 Quantité d'œufs pondus..…….……57

2.3 Qualité des œufs pondus ……..…..57

3. Blocage de la croissance folliculaire en l'absence de mir-202……..……59

3.1 Chez les juvéniles…….59

3.2 Chez les adultes « stériles » ……59

3.3 Chez les adultes « sous-fertiles» ……..…..61

4. Dérégulation majeure des gènes ovariens clés en l'absence de miR-202……61

4.1 Régulation des gènes marqueurs exprimés dans les cellules somatiques……61

4.2 Régulation négative des gènes marqueurs exprimés dans la niche germinale……62

4.3 Régulation d'autres gènes jamais mis en évidence dans l'ovogenèse du poisson……63

5. Discussion…….64

5.1 Défaut précoce du développement folliculaire…….…..…64

5.2 Cibles potentielles de miR-202……..…….…....66

CONCLUSION GENERALE ……...…71

PERSPECTIVES……..……73

Les ARNnc impliqués dans l'ovogenèse……..……..73

Analyse des défauts précoces causés par l'absence de miR-202 lors de l'ovogenèse …....74

Etude des cibles potentielles de miR-202……..……....75

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……..…...77

ANNEXES ……..……..85

Annexe 1 : Stades de développement du médaka utilisés dans nos études

Annexe 2 : Localisation de miR-202-5p sur des coupes d'ovaire de femelles adultes réalisées au cryostat

Annexe 3 : Densité et expression des piARN dans les chromosomes 7, 18, 13 et 19

Annexe 4 : Analyse du 1er et 10ème nucléotide des piARN présents dans les 5 clusters ovariens du chromosome 18

Annexe 5 : Localisation des clusters gonadiques et testiculaires dans les chromosomes 13 et 19

Annexe 6 : Distribution et expression des RapiARN, NRapiARN et NRapiARN avec une localisation unique dans les chromosomes

Annexe 7 : Analyse du 1er et 10ème nucléotide des RapiARN, NRapiARN et NRapiARN avec une localisation unique dans les chromosomes

Annexe 8 : Tableau récapitulatif du nombre de piARN (RapiARN et NRapiARN) présents chez le médaka et de leur localisation

Annexe 9 : Liste des 42 NRapiARN les plus exprimés sur les 1121 NRapiARN ovariens avec une localisation unique dans le génome

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photo d'une femelle médaka.……..…..….4
Figure 2 : Coupe transversale d'un ovaire de médaka femelle adulte…….....6
Figure 3 : Représentation schématique de la différence entre un ovocyte et un follicule……..…..…..6
Figure 4 : L'ovogenèse chez le médaka…….8
Figure 5 : Représentation schématique de la régulation de l'ovogenèse……..…….…....10
Figure 6 : Voie canonique de la biogenèse des miARN……...……16
Figure 7 : Biogenèse de piARN…….....22
Figure 8 : Workflow de l'analyse des données issues du séquençage…….30
Figure 9 : Distribution des ARNnc dans les différents tissus du medaka……36
Figure 10 : Distribution des miARN dans les différents tissus du médaka…….38
Figure 11 : Structures secondaires et profils d'expression des miARN ovariens……40
Figure 12 : Profils d'expression de miR-202-5p, miR-187-3p et miR-202-3p dans les tissus du médaka ……42
Figure 13 : Localisation de miR-202-5p, miR-187-3p et miR-202-3p dans l'ovaire adulte du médaka…….42
Figure 14 : Distribution des piARN dans les 24 chromosomes du médaka……44
Figure 15 : Biais au niveau du 1er et 10ème nucléotide des piARN……...44
Figure 16 : Présence de 5 clusters ovariens sur le chromosome 18…….45
Figure 17 : Profils d'expression des miARN et piARN avant et après une étape d'oxydation……...48
Figure 18 : Profils d'expression des 5 piARN dans les différents tissus du médaka……...…48
Figure 19 : Distribution et expression des NRapiARN dans les chromosomes du médaka……50
Figure 20 : Analyse de la fréquence de ponte de femelles miR-202-/- ……...56
Figure 21 : Analyse du phénotype de reproduction des poissons adultes miR-202-/-…….56
Figure 22 : Analyse quantitative d'images d'ovaires de femelles juvéniles miR-202-/- ……58
Figure 23 : Analyse quantitative d'images d'ovaires de femelles adultes « stériles » et « sous-fertiles » miR-202-/-……..58
Figure 24 : Profils d'expression de l'ARNm des gènes ovariens chez les femelles miR-202-/-…….60
Figure 25 : Liste des projets (à venir ou en cours) à l'issue de ce travail…….……72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des 6 miARN les plus exprimés dans l'ovaire……..…38
Tableau 2 : Liste des 5 piARN issus des chromosomes 13 et 18……..…45

LISTE DES ABREVIATIONS

A

A : Adénosine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNg : ADN génomique
Ago : Argonaute
Amh : Muellerian-inhibiting factor
ANOVA : ANalysis Of Variance
ARN : Acide ribonucléique
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messager
ARNnc : ARN non codant
ARNlnc : ARN long non codant
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert

B

Bmp15 : Bone morphogenetic factor 15

C

Cas9 : CRISPR associated protein 9)
Cdc42 : Cell Division Cycle 42
Cdc42se1 : CDC42 Small Effector 1
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cyp17 : Cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase
Cyp19a1a : Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a

D

Dazl : Deleted In Azoospermia 1
DGCR8 : DiGeorge Critical Region 8
DMY : Y-specific DM-domain gene
DNAse : Acide Désoxyribonucléase
dNTP : DésoxyriboNucléotide TriPhosphate
DTT : Dithiothréitol

E

E2 : Estradiol-17β
EDTA : Éthylène diamine tétra acétique
Exp5 : Exportine 5

F

FISH : Hybridation *in situ* à fluorescence
Foxl2 : Forkhead box protein L2
Foxl3 : Forkhead box protein L3
FSH : Follicle Stimulating Hormone

G

G : Guanosine
GSC : Germ stem cell
Gsdf : Gonadal soma derived factor
GVBD : Germinal vesicle breakdown

H

HEN1 : HUA enhancer 1

I

Inha : Inhibine α

K

KO : Knock Out

L

LH : Luteinizing Hormone
LNA™: Locked Nucleic Acid

M

MiARN : MicroARN
MIH : Müllerian-inhibiting hormone
miRISC : miRNA-induced silencing complex
MPF : Maturation promoting factor

N

NGS : Next generation Sequencing
Norad : Non-Coding RNA Activated By DNA Damage
Npr1b : natriuretic peptide receptor 1b
NRapiRNA : Non-Repeat associated piRNAs
nt : nucléotide

P

PCR : Polymerisation Chain Reaction
PFA : paraformaldéhyde
PGC : Primordial Germ Cell
piARN : ARNs interagissants avec les protéines PIWI
PIWI : P -element induced WImpy testes
Pré -miARN : précurseur de miARN
Pri -miARN : précurseur primaire de miARN
Prost : Processing of short transcripts

Q

qPCR : PCR quantitative

R

RapiRNA : Repeat associated piRNAs
RasiARN : repeat-associated small interfering RNAs
Rbfox2 : RNA Binding Fox-1 Homolog 2
RISC : RNA-induced Silencing Complex
RT : Transcription inverse

S

setd4 : SET domain containing 4
siARN : small interfering RNA
SMAD : MotherS Against Decapentaplegic homolog
snARN : small nuclear ARN
sno-pré-miARN
Sox9 : Transcription Factor Sox9
srgap3 : SLIT-ROBO Rho GTPase Activating Protein 3
Stat3 : Signal transducer and activator of transcription 3
Ste : Stellate
Su(Ste) : suppresseur de Stellate
Sycp3 : Synaptonemal Complex Protein 3

T

TALENs : Transcription activator-like effector nucleases
TE : éléments transposables
TGF: Transforming growth factor

U

U : Uridine
UTR : UnTranslated Region

V

Vtgs : vitellogénines

W

Wnt : wingless-related integration site
WT : Wild Type

Z

ZFN : Zinc Finger Nucleases

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. La reproduction

La reproduction est une des fonctions fondamentales de la vie car elle assure la perpétuation de l'espèce et constitue une des composantes clés de l'évolution des espèces. Cette grande fonction, partagée par tous les organismes vivants qu'ils soient unicellulaires ou pluricellulaires, animaux ou végétaux, peut-être « sexuée ou asexuée ». La reproduction asexuée repose sur la capacité des organismes vivants à se multiplier sans partenaire (mitose simple ou multiple, bourgeonnement, scissiparité et parthénogénèse) et à contrario, la reproduction sexuée implique la participation de deux parents de même espèce et de sexes différents (fusion des gamètes mâle et femelle aboutissant à la formation d'un œuf). La reproduction sexuée concerne la majorité des animaux de notre planète et permet le maintien d'une diversité génétique au sein des populations en assurant un brassage génétique.

Chez les poissons, la reproduction est principalement de type sexué. Malgré le fait que ce type de reproduction semble partagé par l'ensemble des 30.000 espèces de poissons actinopterygien, des différences fondamentales existent. Un exemple frappant de ces différences est la fécondité (nombre d'œufs produits par les femelles), qui peut être très variable d'une espèce à une autre, allant de quelques dizaines à plusieurs millions d'œufs pondus par femelle (Jalabert, 2005). Le processus biologique impliqué dans la fécondité est appelé l'ovogenèse qui correspond à la « fabrication » du gamète femelle à partir d'une cellule souche germinale. Il a lieu au sein de l'ovaire. Il s'agit d'un processus complexe régulé par de nombreux acteurs extra et intra-ovariens et pouvant être influencé par de nombreux paramètres externes (alimentation, génétique, milieu de vie, état de santé). Depuis de nombreuses années, les chercheurs étudient les facteurs endocriniens et génétiques impliqués dans l'ovogenèse pour avoir une meilleure compréhension de sa régulation. Plus récemment, de nouveaux acteurs retrouvés dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques, ont fait leur apparition : les ARNs non codants. **Lors de ce travail, nous avons donc cherché à mieux comprendre l'implication de ces ARNs non codants dans la régulation de l'ovogenèse. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le médaka comme modèle, pour ses nombreux avantages pour la biologie de la reproduction.**

2. Le médaka

2.1 Généralité

Le médaka *(Oryzias latipes)* appartient à la sous-classe des téléostéens qui représente actuellement 99,8% des poissons. Il est originaire des régions côtières d'Asie du Sud-Est et possède une capacité d'adaptation à un large spectre de températures (10-40°C) et de salinité qui lui permet de vivre dans différents types d'habitats (eaux saumâtres, marais acides, rizières, trous d'eau …).



Figure 1 : Photo d'une femelle médaka. Les œufs restent attachés sous le ventre de la femelle par des filaments pour être fécondés. (Le forum international de medaka, Bitter. F, http://medaka.eu/resources/miyuki-medaka-super-long-line-light-5-paare.5/)

Dépourvu d'intérêt économique, du fait de sa petite taille peu adaptée à une consommation alimentaire par l'homme, le médaka a longtemps été un poisson d'ornement très populaire en aquarium d'eau douce.

C'est au début du siècle dernier que les scientifiques ont commencé à utiliser le médaka pour étudier la transmission des gènes, la détermination du sexe et la pigmentation. Il est également le premier poisson chez lequel ont été validées les lois mendéliennes de l'hérédité (Toyama, 1916) et chez lequel a été établi une hérédité partielle liée au chromosome Y (Aida, 1921). Le séquençage complet de son génome a débuté en 2002 pour être publié 6 années plus tard (Ahsan *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, le médaka est couramment utilisé au sein des laboratoires pour étudier le comportement sexuel, l'héritage génétique de la coloration, les habitudes de frai, l'alimentation, les pathologies, le développement de l'embryon, l'écologie, … (Wittbrodt *et al.*, 2002).

2.2 Poisson modèle pour la biologie de la reproduction

Le médaka est facile à élever, robuste et offre la possibilité d'utiliser tous les outils génomiques et moléculaires nécessaires pour des études fonctionnelles *in vivo*, incluant un génome séquencé et une facilité d'édition du génome par l'approche CRISPR/Cas9 (Ozato et al., 1992 ; Wittbrodt *et al.*, 2002 ; Kirchmaier *et al.*, 2015). Il possède des chromosomes sexuels X et Y, ainsi qu'un « gène déterminant du sexe » sur le chromosome Y. Ce gène, DMY/dmrt1bY, enclenche les mécanismes moléculaires permettant la différenciation sexuelle vers le sexe mâle.

La reproduction du médaka en laboratoire est parfaitement maitrisée avec des pontes régulières et quotidiennes d'œufs, et dépend étroitement de la photopériode (Weber et Spieler, 1987). Jusqu'à l'âge de 3 mois les médaka juvéniles sont placés dans des conditions de « croissance » (12h de lumière / 12h de noir) pour permettre leur développement. A l'âge de 3 mois, ils sont ensuite placés dans des conditions de « reproduction » avec une photopériode de jours longs (14h de lumière / 10h de noir). Pendant cette période de reproduction, l'allumage de la lumière stimule l'accouplement, la ponte des œufs (entre 20 et 30 œufs) et l'émission de sperme. Après la ponte, les œufs restent attachés en grappe, par des filaments, sous le ventre de la femelle où ils seront fécondés par le mâle (figure 1). Enfin, les embryons du médaka se développent rapidement (9 jours jusqu'à l'éclosion) et ont l'avantage d'être transparents, ce qui facilite le suivi de l'embryon.

En résumé, contrairement au poisson-zèbre, qui présente également de nombreux avantages (embryon transparent, cycle court) qui en font un modèle plébiscité y compris pour des études à finalité de médecine humaine (cancérologie, angiogenèse, toxicologie), le médaka dispose d'un déterminisme sexuel génétique bien établi et un cyle reproducteur très régulier (pontes quotidiennes) qui constituent des atouts pour les études portant sur la reproduction.

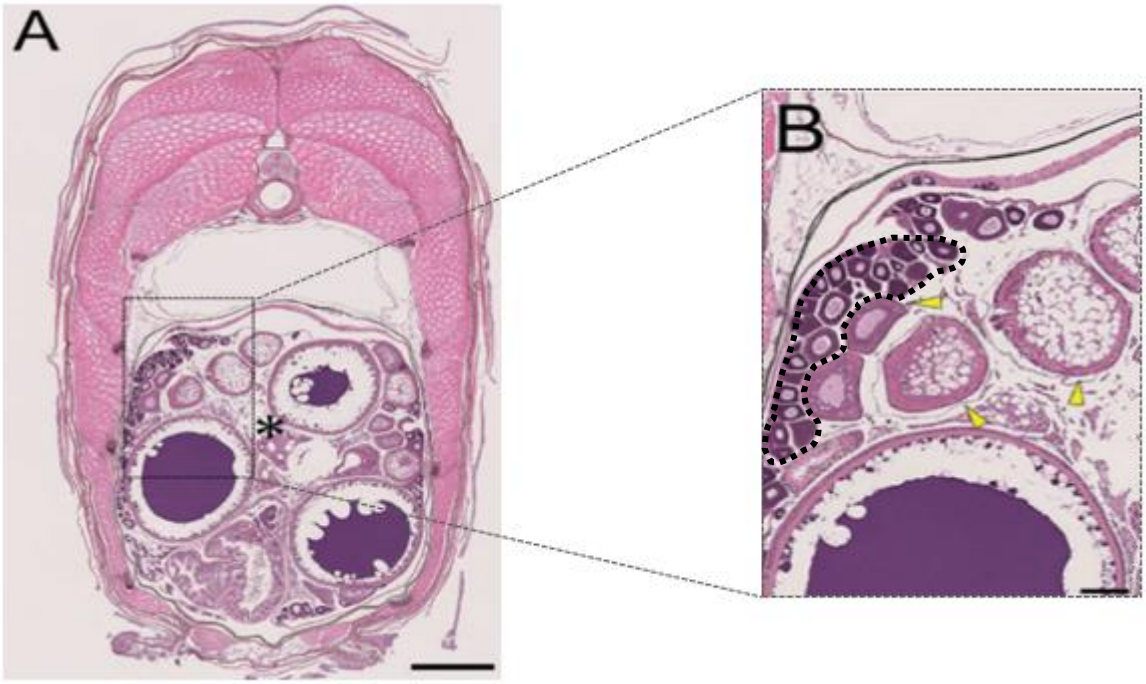


Figure 2 : Coupe transversale d'un ovaire de médaka femelle adulte (Nakamura, 2018). (A) L'astérisque noir indique l'ovaire. (B) Agrandissement d'une partie de l'ovaire contenant une niche germinale (délimitation en pointillée) et des ovocytes plus matures dans le compartiment stromal non rattachés à l'épithélium germinatif (flèches jaunes).

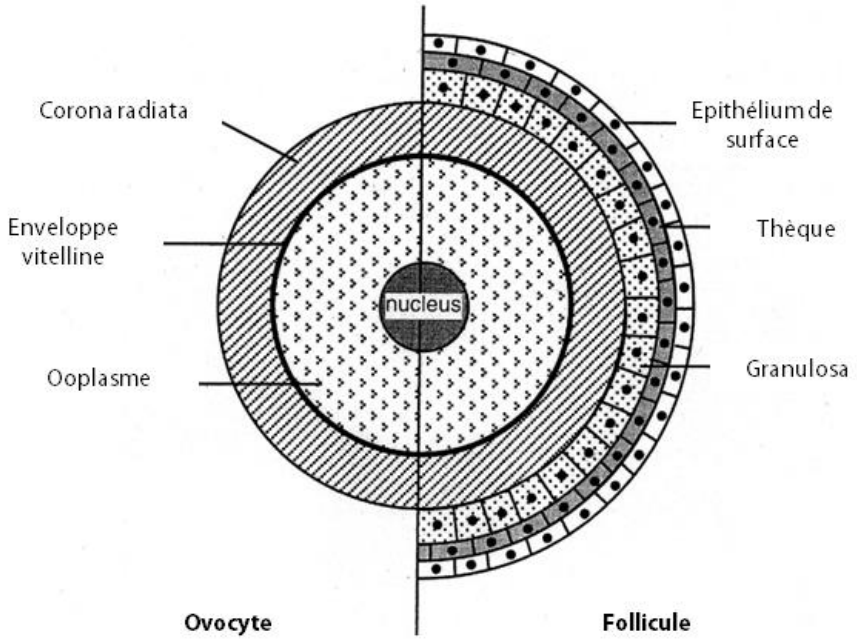


Figure 3 : Représentation schématique de la différence entre un ovocyte et un follicule (adapté de Tyler and Sumpter, 1996).

2.2.1 Structure de l'ovaire

L'ovaire de médaka est composé de deux parties distinctes : un compartiment stromal, où les follicules se développent, et une cavité ovarienne. Ces deux compartiments sont séparés par une couche cellulaire appelée « épithélium germinal ». L'épithélium germinal est constitué d'unités histologiquement distinctes appelées « niches germinales » (figure 2, délimitation en pointillée). Ces niches contiennent des cellules germinales souches (GSC ou « germ stem cell ») ainsi que des cellules germinales dans leurs premiers stades de développement ovogénétique (ovogonies et ovocytes de stade I et II, figures 4 et 5). Chez le médaka, les niches germinales servent de lieu de néo-ovogenèse. Contrairement aux mammifères, le médaka (comme tous les poissons) ne possède pas de stock initial fixe de cellules germinales qui va s'épuiser au cours du temps, mais va être continuellement réapprovisionné par les GSC tout au long de sa vie d'adulte. Ces GSC vont proliférer de facon illimitée pour constituer un stock pérenne de cellules germinales, tandis qu'une autre partie de ces cellules se differenciera pour donner les ovogonies, qui eux-même poursuivront leur développement et entreront en méiose pour donner un ovocyte mature de stade I (Lin, 1997 ; Nakamura *et al.,* 2010). Au cours du développement de l'ovogonie jusqu'à l'ovocyte de stade II, les cellules germinales vont s'entourer de cellules somatiques gonadiques, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque, et former les follicules (figure 3).

Le médaka possède un développement ovarien de type asynchrone, ce qui signifie que les ovocytes ne rentrent pas tous en ovogenèse en même temps et par conséquent que son ovaire contient une large gamme d'ovocytes à différents stades de différenciation et donc de follicules de différentes tailles (figure 2). Au moment de l'ovulation, seuls quelques (20-30) ovocytes différenciés et matures sont pondus sous l'influence de signaux moléculaires et environnementaux, tandis que les autres restent stockés dans l'ovaire pour une future ponte.

L'ovaire assure deux fonctions : d'une part une fonction exocrine par laquelle il assure la croissance, la maturation et la libération d'un ovocyte prêt à être fécondé (ovogenèse) ; et d'autre part une fonction endocrine par laquelle les cellules somatiques gonadiques synthétisent les hormones sexuelles (progesterones et oestrogènes) indispensables à la reproduction (stéroïdogenèse). Ces fonctions ovariennes sont régulées par des hormones gonadotropes, la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone) synthétisées au niveau de l'hypophyse.

2.2.2 L'ovogenèse chez le medaka

L'ovogenèse est le processus permettant le développement (croissance et maturation) d'une cellule germinale précoce, l'ovogonie, pour aboutir à un ovocyte mature prêt à être fécondé. Chez le médaka, l'ovogenèse a été décrit en 5 phases basées sur des caractéristiques morphologiques (figure 4, Iwamatsu *et al.,* 1988) :

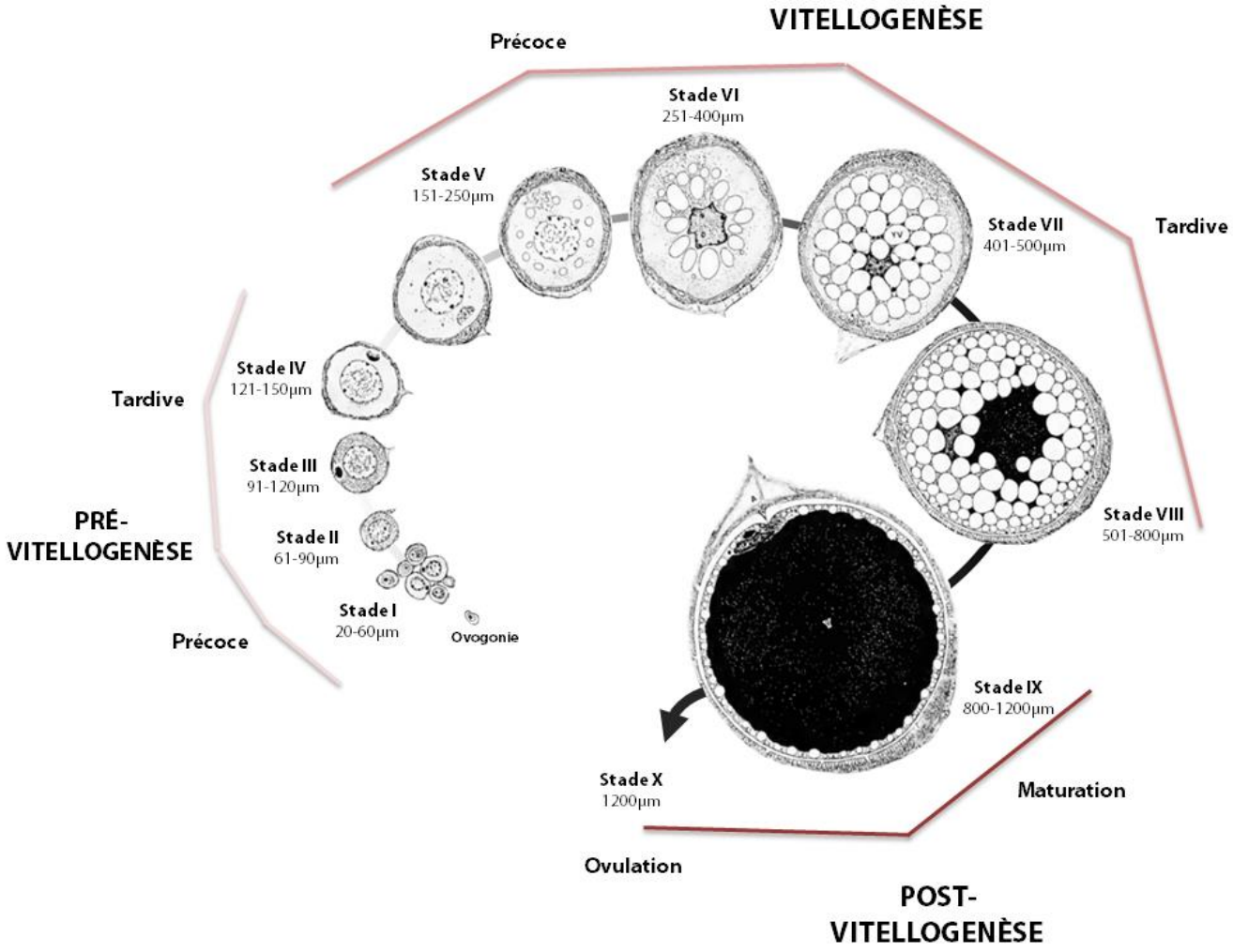


Figure 4 : Ovogenèse chez le médaka. L'ovogenèse chez le médaka est organisée en 5 phases : pré-vitellogenèse précoce et tardive, vitellogenèse précoce et tardive et post-vitellogenèse. Ces 5 étapes regroupent 10 stades numérotés de I à X. (Schéma modifié d'après Iwamatsu *et al.*, 1988)

La phase appelée « pré-vitellogenèse précoce » (stades I et II), se déroule dans la niche germinale et est caractérisée par un grossissement de la taille de l'ovocyte qui mesure entre 20 à 90 µm. Cette augmentation de taille est dûe à une abondance de structures nécessaires à la production des facteurs maternels ainsi qu'à l'apparition de nucléoles dans le noyau ayant pour rôle la production d'ARN messagers ribosomaux indispensables à la production des protéines (Wallace et Selman, 1990). Durant cette phase, l'ovocyte entre en méiose et s'arrête en prophase de la première division méiotique.

La phase appelée « pré-vitellogenèse tardive » est caractérisée par la formation du chorion ainsi que l'apparition des filaments d'attachement de la surface du follicule. Les ovocytes mesurent entre 91 et 150 µm (stades III et IV). Ils sont maintenant dans le compartiment stromal mais toujours bloqués en prophase de la première division méiotique. Les corps lipidiques apparaissent et continueront à s'accumuler au cours de la vitellogenese. La présence de nucléoles et d'autres organites cellulaires durant cette phase, est le signe d'une production continue de facteurs maternels par l'ovocyte (Babin *et al.*, 2007).

La phase appelée « vitellogenèse précoce » est caractérisée par une augmentation accrue de la taille de l'ovocyte, entre 151 et 400 µm (stades V et VI). L'ovocyte, toujours arrêté en prophase I, accumule des réserves trophiques (le vitellus) qui permettront à l'embryon de se développer, jusqu'à ce qu'il soit capable de s'alimenter de façon autonome.

Lors de la phase appelée « vitellogenèse tardive », la taille de l'ovocyte continue à augmenter jusqu'à 800 µm (stades VII et VIII). Cependant, le nombre de nucléoles semble diminuer en fin de vitellogenèse, signe d'une baisse de la production de facteurs maternels (Wallace et Selman, 1990). A ce stade, le noyau commence à migrer vers le pôle animal où le chorion (environ 5 µm d'épaisseur) est plus épais que dans la région du pôle végétal.

La phase appelée « post-vitellogenèse » se distingue par la reprise de la méiose (stade IX). En effet, l'ovocyte va poursuivre son cycle jusqu'à la métaphase II où il restera bloqué jusqu'à la fécondation. Durant ce stade de maturation, la croissance se poursuit jusqu'à atteindre sa taille finale de 1200 µm. De plus, la rupture de la vésicule germinale « GVBD » (« germinal vesicle breakdown») entraine la disparition du noyau (Babin *et al.*, 2007). Enfin, il y a ovulation de l'ovocyte dans la cavité ovarienne suite à la rupture des enveloppes folliculaires (stade X). L'ovocyte expulsé garde les filaments d'attachement qui émergent de son chorion et mesure alors ≈ 1200 µm (Iwamatsu *et al.*, 1988).

Une fois sorti de l'ovaire, l'ovocyte va être stocké dans la cavité ovarienne jusqu'à son expulsion compléte. Chez le médaka, cette phase « post-ovulatoire » est très courte.

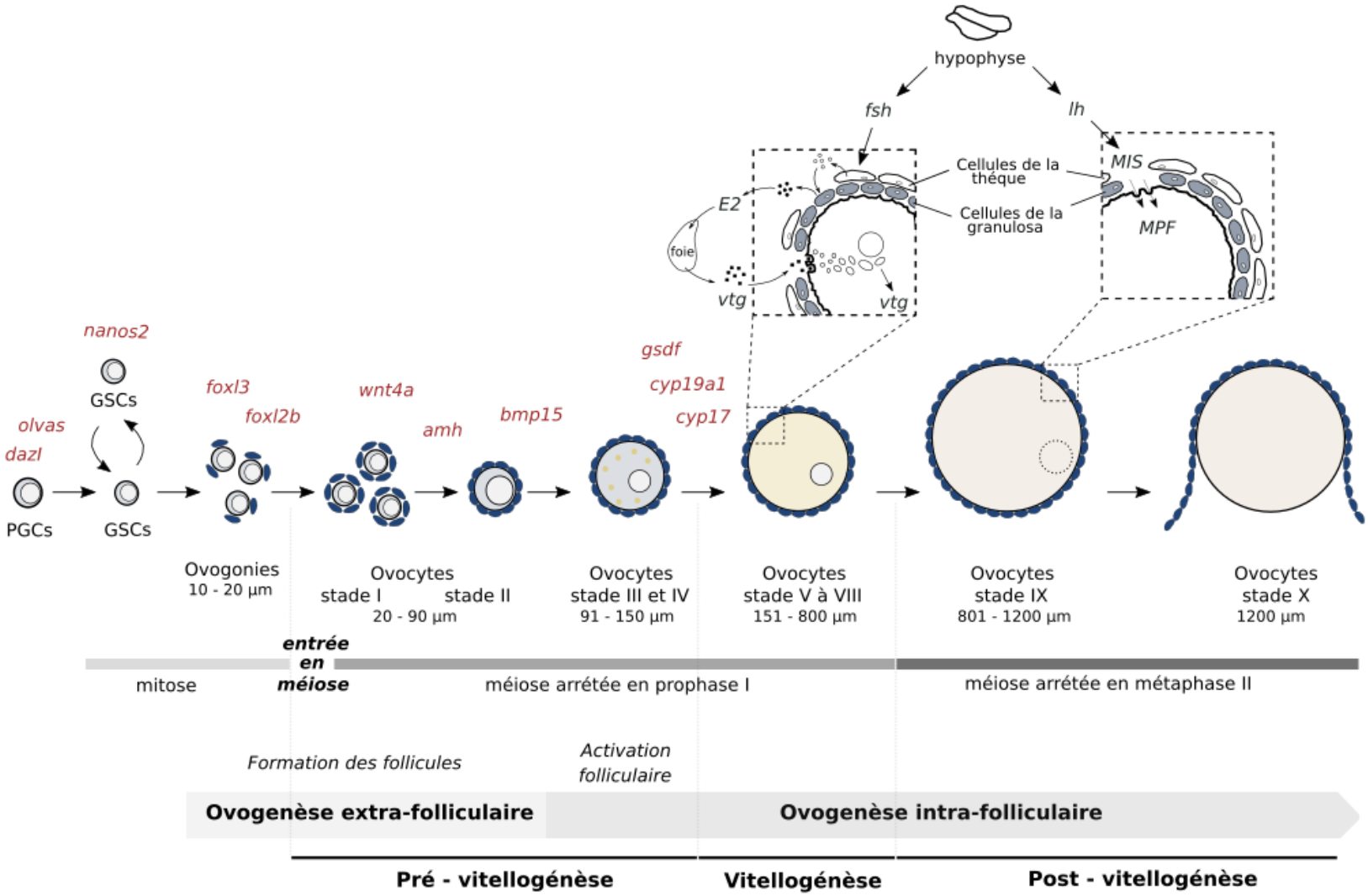


Figure 5 : Représenstation schématique de la régulation de l'ovogenèse. Illustration de gènes sélectionnés impliqués dans le développement des ovaires, révélés par des approches de KO (adapté de Li et Ge, 2020 et de Nagahama et Yamashita, 2008)

2.2.3 Interaction entre les cellules somatiques et les ovocytes

Durant les premiers stades de l'ovogenèse les ovocytes vont s'entourer de couches cellulaires composées de cellules somatiques gonadiques (cellules de la granulosa et cellules de la thèque) pour aboutir à la production du follicule. Ces cellules somatiques vont proliférer et se différencier pour former une couche de soutien autour des ovocytes au fur et à mesure que leur diamètre augmente et vont permettre les échanges nécessaires à plusieurs étapes du développement, notamment pour la croissance et la maturation ovocytaire (stades IV à X). Lors du developpement folliculaire, une communication paracrine va s'établir entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent (Nagahama et Yamashita, 2008).

3. Contrôle génétique et endocrinien de l'ovogenèse

Ces dernières années, l'utilisation d'outils d'édition de gène (ZFN, TALENs et CRISPR/Cas9) a permis de mettre en évidence les fonctions de nombreux gènes dans la gamétogénèse, ainsi que d'identifier de nouveaux régulateurs essentiels tout au long du développement ovarien (Edson *et al.*, 2009 ; Li et Ge, 2020). Ces études, principalement réalisées avec des lignées knock-out (KO) chez la souris et chez le poisson-zèbre, ont montré qu'un certain nombre de ces régulateurs étaient retrouvés chez différentes espèces de vertébrés dont les poissons téléostéens, suggérant une certaine conservation du processus de différenciation des gonades au cours de l'évolution.

Dans ce travail nous utiliserons la nomenclature officielle de chaque espèce (https://incenp.org/notes/2012/gene-nomenclature.html) pour nommer les gènes et les protéines. Pour nous référer aux mammifères, nous utiliserons la nomenclature souris. Les gènes seront écrits en *italique* avec une majuscule « *Gène* », et les protéines en majuscule « PROTEINE ». Concernant les téléostéens, nous utiliserons la nomenclature zebrafish les gènes seront écrits en *italique* « *gène* », et les protéines avec une majuscule « Protéine ». Pour les descriptions plus générales, nous utiliserons la nomenclature des mammifères.

Voici quelques exemples de gènes clés impliqués dans la régulation de l'ovogenèse chez les téléostéens dont le médaka (figure 5) :

3.1 Les cellules germinales primordiales

Les cellules germinales proviennent d'une petite population de cellules pluripotentes apparaissant très tôt au cours du développement embryonnaire, les cellules germinales primordiales (PGC ou « Primordial germ cells »). Les PGC contiennent des composants connus sous le nom de plasma germinatif contenant les déterminants de la lignée germinale, ARNm et protéines. Elles sont préformées en dehors de l'emplacement de la future zone gonadique et vont ensuite migrer à travers l'embryon, sous l'influence de leur environnement (expression de gènes, interactions avec les

cellules somatiques, …) pour atteindre la zone des futures gonades (Raz, 2003 ; Herpin *et al.*, 2007). Après leur établissement dans la gonade, les PGC vont se différencier pour donner les cellules germinales souches (GSC, ou « Germ stem cells »). Ces GSC ont une très forte capacité mitotique et vont proliférer de façon illimitée pour constituer un stock de cellules germinales tout au long de la vie du médaka (Lin, 1997 ; Yuan et Yamashita, 2010). Une partie de ces GSC va entrer dans le processus d'ovogenèse pour donner des cellules germinales très précoces appelées ovogonies (figure 5).

Ces vingt dernières années, une douzaine de gènes impliqués dans la régulation de la formation et de la migration des PGC a été identifiée (Xu *et al.*, 2010). Parmi eux, le gène ***ddx4*** (anciennement *vasa*), membre de la famille de protéine DEAD box, a été le premier marqueur des PGC à avoir été identifié chez le poisson-zèbre (Yoon *et al.*, 1997). Quelques années après, son expression a également été détectée dans des cellules germinales chez le médaka lors des premiers stades de développement. Chez le médaka, *ddx4* est utilisé comme marqueur des cellules germinales lors de la distribution et de la migration des PGC au cours des premiers stades de la formation du corps embryonnaire (Shinomiya *et al.*, 2000). Un autre exemple de gène dont le rôle a été décrit dans le développement des PGC chez plusieurs vertébrés notamment chez la souris, le xénope, et le medaka est le gène ***Daz1*** **(**Deleted In Azoospermia 1**),** membre de la famille de gènes *daz* (Ruggiu *et al.*, 1997 *;* Houston et King, 2000 *;* Li *et al.*, 2016). Il a été montré que la déplétion de *dazl* chez le Xénope entraîne un défaut de développement des PGC ainsi que la stérilité chez les souris mâles et femelles. Chez le médaka, Li *et al.* ont mis en évidence un niveau élevé de la protéine Daz1 jusqu'à la gastrulation, correspondant à la période de formation des PGC. Ils ont montré qu'en neutralisant l'activité de Daz1, par l'utilisation d'un anticorps anti-Dazl, ils étaient capables d'abolir la formation des PGC dans les embryons. Ces résultats suggèrent que chez le xénope et le médaka, DAZ1 est impliqué dans la formation précoce des PGC.

En ce qui concerne les cellules germinales souches, elles sont difficilement identifiables et généralement cachées dans l'environnement cellulaire complexe de la niche germinale. Cependant quelques rares gènes permettent de les détecter. Par exemple ***Nanos2,*** membre de la famille de régulateurs traductionnels, qui a été montré comme impliqué dans le développement des cellules germinales de nombreux organismes (Tsuda *et al.*, 2003 ; De Keuckelaere *et al.*, 2018). *nanos2* a été identifié comme un gène marqueur des GSC chez le poisson-zèbre (Draper, 2017). Récemment, des études chez le mutant n'exprimant plus *nanos2* ont confirmé que ce gène est nécessaire au maintien des GSC mais pas à l'établissement du stock initial (Cao *et al.*, 2019). En effet, Cao *et al.* ont montré qu'à des stades précoces (en présence d'ovogonies) l'établissement initial des GSC se fait correctement chez le mutant mais, qu'à des stades plus tardifs du développement les cellules germinales sont absentes de l'ovaire.

3.2 Ovogenèse extra-folliculaire (pré-vitellogenèse précoce : ovogonie à ovocyte de stade II)

Les ovogonies se multiplient par division mitotique et, entourés de cellules de pré-granulosa, commencent à former des groupes cystiques de cellules germinales. Les ovogonies vont ensuite se différencier en ovocytes de stade I. A ce stade, une monocouche de cellules somatiques applatis commence à recouvrir les ovocytes. Lors de la division méiotique, les ovocytes de stade I vont se bloquer en prophase et continuer leur croissance pour donner des ovocytes de stade II. A ce stade, plusieurs couches de cellules de la granulosa et de la thèque recouvrent les ovocytes pour former les follicules.

Un des acteurs moléculaires jouant un rôle clé lors de la division mitotique des ovocytes est le géne ***Foxl3*** (Forkhead box protein L3). Chez le médaka, *foxl3* a été mis en évidence dans les cellules germinales précoces chez la femelle et chez le mâle mais reste seulement présent lors de la division cystique de cellules germinales de la femelle, avant l'entrée en méiose (Nishimura *et al.*, 2015; Nishimura et Tanaka, 2016). La déplétion de *foxl3* chez les femelles entraine une entrée dans la spermatogenèse, montrant ainsi que le gène *foxl3* réprimerait l'engagement dans la différenciation mâle. Un des autres acteurs les plus connus de la différenciation des ovocytes en pré-vitellogenèse précoce est le gène ***Foxl2*** (Forkhead box protein L2), codant pour un facteur de transcription. Chez le poisson-zèbre, ce gène est dupliqué et deux copies, *foxl2a* et *foxl2b*, ont été identifiées (Crespo *et al.*, 2013). L'expression de *foxl2a* et *foxl2b* est restreinte aux cellules de la granulosa. L'absence de *foxl2a* et de *foxl2b* provoque l'arrêt des follicules contenant des ovocytes de stade II, puis l'inversion complète du sexe de femelle à mâle (Yang *et al.*, 2017). Ce phénomène d'inversion de sexe est un phénomène assez courant chez de nombreuses espèces de poissons, qui peut être causé par plusieurs facteurs génétiques ou environnementaux (température, polluants, …). Chez le médaka, *foxl2b* est la seule copie de *foxl2* conservée après la duplication du génome spécifique aux téléostéens (Bertho *et al.*, 2016). Dans l'ovaire adulte, il est exprimé dans les cellules de la granulosa en pré-vitellogenèse précoce et maintenu jusqu'à la vitellogenèse, mais l'expression cesse dans les follicules en post-vitellogenèse (Nakamoto *et al.*, 2006). Enfin, les auteurs suggèrent que Foxl2 pourrait jouer un rôle essentiel dans la différenciation des cellules de la granulosa, et que sa fonction pourrait être conservée tout au long de l'évolution chez les vertébrés. Un autre gène connu pour son rôle dans le développement ovarien précoce est le gène ***Amh*** (Muellerian-inhibiting factor). Il s'agit d'un membre de la famille des TGFβ (Transforming growth factor β) mis en évidence dans les cellules de la granulosa et dans les cellules de sertoli (cellules somatiques de soutien chez le mâle) chez les mammifères et les téléostéens (Durlinger *et al.*, 1999 ; Rodríguez-Marí *et al.*; 2005 ; Klüver *et al.*, 2007). Chez le poisson-zèbre, l'absence de *amh* chez les femelles aboutit au développement d'ovaires hypertrophiques dû à une augmentation

de la prolifération des ovogonies ainsi qu'à des défauts lors de leur différenciation, ce qui mène à une diminution des ovocytes aux plus tardifs (Lin *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent que *Amh* aurait un rôle indispensable dans la prolifération et/ou la différenciation ovogoniale en inhibant la division des ovogonies pour permettre leur entrée en différenciation ovocytaire.

3.3 Activation folliculaire (pré-vitellogenèse tardive : ovocyte de stade III à IV)

Les ovocytes continuent à grossir et des vésicules vitellines commencent à apparaitre. Autour, les cellules de la granulosa et de la thèque continuent également à se diviser et à se différencier. Un des gènes impliqué dans la prolifération des cellules de la granulosa lors de la pré-vitellogenèse tardive chez les téléostéens est ***bmp15*** (*bone morphogenetic factor 15*), un membre de la superfamille des TGFβ (Wu and Matzuk, 2002 ; Clelland *et al.*, 2006). Chez le poisson-zèbre, Bmp15 est présent dès la formation des premiers follicules, et perdure tout au long de la croissance folliculaire. Les femelles mutantes pour ce gène présentent un développement folliculaire initialement normal, puis les ovocytes stoppent leur développement en fin de pré-vitellogénèse, ce qui conduit à une inversion de sexe (Dranow *et al.*, 2016). Ainsi, tous les mutants adultes obtenus sont des mâles fertiles.

En fin de pré-vitellogénèse, la croissance folliculaire devient dépendante des gonadotrophines sécrétées par l'hypophyse, à savoir la LH (hormone luteinissante) et la FSH (hormone folliculostimulante). Cette transition des follicules ovariens est marquée par l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonade chez les femelles.

3.4 Grossissement des follicules (vitellogénèse : ovocyte de stade V à VIII)

Au cours de la vitellogénèse, les follicules ovariens se développent de façon spectaculaire en raison de la croissance de l'ovocyte (dû à l'accumulation des réserves nutritionnelles dans l'ooplasme) qui devient de plus en plus opaque (Selman *et al.*, 1993). Contrairement aux mammifères, les ovocytes de poissons ont besoin de stocker notamment des protéines riches en phospholipides, issus du clivage de précurseurs appelés vitellogénines (Vtgs), qui serviront de réserves nutritionnelles indispensables pour le futur développement de l'embryon (Nagahama, 1994). Pour cela, en réponse à la sécrétion de la FSH hypophysaire, les androgènes produits par les cellules de la thèque vont être transformé en estradiol-17β (E2) dans les cellules de la granulosa. L'E2 va être ensuite sécrétée dans les vaisseaux sanguins pour stimuler la synthèse des Vtgs par le foie. Enfin, les Vgts vont être transportées dans le flux sanguin vers l'ovaire, incorporées par les ovocytes en croissance et être converties en protéines pour être stockées dans l'ooplasme (Hiramatsu *et al.*, 2015).

Le mécanisme de transformation des androgènes en œstrogène implique une cascade de gènes incluant ***cyp19a1a*** (aromatase) et ***cyp17*** (cytochrome P45017A1). Chez le poisson-zèbre, les mutants de ces gènes présentent des phénotypes semblables, qui consiste à un défaut de développement des follicules (Yin *et al.*, 2017 ; Zhai *et al.*, 2018). Tous les mutants adultes deviennent des mâles fertiles. Un traitement à la testostérone ou à l'E2 permet de restaurer le phénotype sauvage suggérant fortement que le défaut de croissance observé en l'absence de cyp19 ou cyp17 est lié à une carence en œstrogènes et androgènes (Zhai *et al.*, 2018). De nombreux autres gènes, tel que ***Gsdf*** (gonadal soma derived factor), sont nécessaires à la maturation des follicules ovariens et à l'expression des gènes pour la biosynthèse des stéroïdes (Guan et al., 2017 ; Yan et al., 2018). Le gène *gsdf* a été identifié pour la première fois dans les cellules somatiques des gonades chez la truite arc-en-ciel (Sawatari *et al.*, 2007). Chez le poisson-zèbre, l'expression de *gsdf* a été détectée spécifiquement dans les cellules de la granulosa de l'ovaire (Gautier *et al.*, 2011). Dans cette étude, Gautier *et al.* ont montré que les femelles mutantes pour *gsdf* sont brièvement fertiles, puis deviennent stériles car des follicules contenant les ovocytes de stade II s'accumulent. En 2017, Yan et al. ont mis en évidence une expression considérablement réduite des *vtgs* chez les femelles mutantes *gsdf* confirmant une altération de la vitellogénèse (Yan *et al.*, 2017).

3.5 Maturation des ovocytes et ovulation (post-vitellogenèse : ovocytes stades IX et X)

Une fois que l'ovocyte a terminé sa croissance, il entre dans la phase finale de maturation (stade IX). Au cours de cette phase, les ovocytes reprennent la méiose, à partir de l'arrêt au premier stade de la prophase méiotique jusqu'en métaphase II (Nagahama et Yamashita, 2008). Cette reprise se fait en réponse à la LH qui va permettre la production de la MIS («maturation inducing steroid »), hormone induisant la maturation au niveau folliculaire. Cette hormone va se lier à ses récepteurs apparentés situés dans la membrane de l'ovocyte pour stimuler l'activation de la MPF (« maturation promoting factor »), facteur intracellulaire de la maturation.

Enfin, l'ovulation (stade X) est le processus permettant la libération des ovocytes matures de l'ovaire dans la cavité ovarienne. Au cours de ce processus, les follicules pré-ovulatoires subissent des changements morphologiques spectaculaires. Les liens entre les cellules de l'ovocyte et de la granulosa sont brisés pendant la maturation, et plusieurs protéases digèrent une zone de la couche folliculaire, ce qui permet aux ovocytes d'être libérés (Clelland and Peng 2009). Comme chez de nombreux vertébrés, la LH est également essentielle pour l'ovulation chez les poissons (Li et Cheng, 2018 ; Nagahama et Yamashita, 2008).

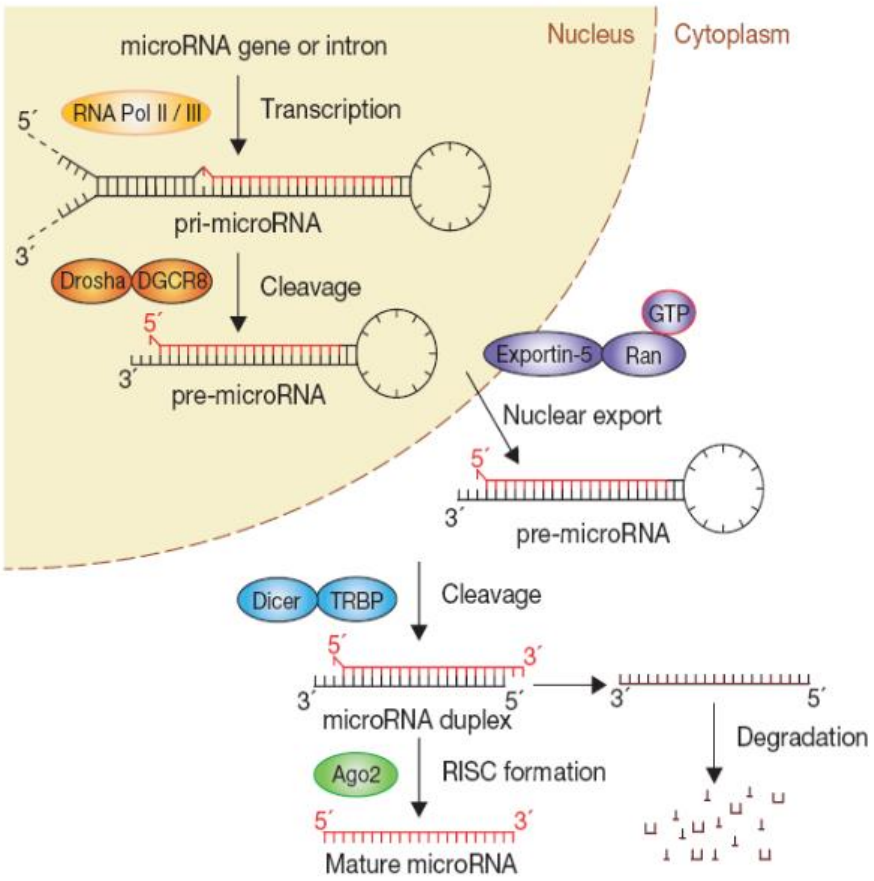


Figure 6 : Voie canonique de biogenèse des miARN. Synthèse et devenir des deux brins matures des miARN (Winter *et al.*, 2009).

4. Les ARN non codants

Les recherches menées au cours des dernières décennies ont montré que seule une très faible portion du génome (moins de 2% chez l'homme) codait pour des protéines et que les parties non codantes restantes étaient principalement composées de séquences introniques, régulatrices ou répétées (Chi, 2016). La découverte récente d'une nouvelle classe de gènes, produisant des ARN fonctionnels et non des protéines, et jouant un rôle important dans différents mécanismes, telles que la régulation de l'expression génique ou la stabilisation du génome, a suscité l'intérêt de la communauté scientifique : les ARN non codants (ARNnc).

Les ARNnc sont communément classifiés selon leur longueur avec les longs ARN non codants (ARNlnc) dont la taille est supérieure à 200 nt et les petits ARN non codants incluant les micro-ARN (miARN), les ARN nucléolaires (snoARN), les ARN nucléaires (snARN), les ARN interférents (siARN), les ARN de transfert (ARNt) et les ARN interagissant avec les PIWI (piARN).

Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux petits ARNnc impliqués dans la régulation de l'expression génique : les miARN et les piARN.

4.1 Les microARN

Les miARN sont une classe de petits ARNnc endogènes de 21 à 25 nucléotides, impliqués dans la régulation de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel (Bartel, 2004).

La première étude qui a mis en évidence ces ARN s'intéressait au gène *Lin-4* dans le développement larvaire chez *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993). Au cours de ce travail, Lee *et al.* ont montré que le gène *Lin-4* ne codait pour aucune protéine mais entrainait une accumulation de petits ARN qui régulaient l'abondance de la protéine LIN-14. Quelques années plus tard, une autre étude a confirmé ce mécanisme de régulation en précisant que ces miARN, transcrits par le gène *Lin-4*, se fixait à la région 3'UTR de l'ARNm de *Lin-14*. La complémentarité entre ces miARN et l'ARNm de *Lin-14* n'est pas parfaite mais elle est suffisante pour inhiber la traduction de la protéine LIN-14 (Banerjee et Slack, 2002). Il a fallu attendre le début des années 2000 pour découvrir l'importance du rôle de ces miARN dans la régulation de nombreuses voies cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose (Hwang et Mendell 2006 ; Staton *et al.*, 2011 ; Su *et al.*, 2015). Depuis, les miARN ont également été décrits comme étant très conservés au cours de l'évolution, des plantes jusqu'à l'homme, renforçant ainsi l'importance de leurs fonctions dans la régulation de l'expression génique.

4.1.1 Biogenèse et mode d'action des miARN

Depuis leur découverte, plusieurs voies de biogenèse des miARN ont été mises en évidence. La voie la plus commune chez les animaux est la voie dite « canonique », mais d'autres

voies alternatives, dites « non canoniques », indépendantes de Drosha ou Dicer ont également été identifiées. Il s'agit en particulier des voies de biogénèse des miRtrons, des simtrons, des sno-pré-miARN et des ARNt-pré-miAR.

En ce qui concerne la voie canonique, les gènes de miARN sont tout d'abord transcrits par l'ARN polymérase II en de longs précurseurs appelés « pri-miARN » (figure 6). Ces pri-miARN, de plus de 1 kb, possèdent une structure en forme de tige-boucle (ou épingle à cheveux) présentant des extrémités simple brin en 5' et 3' ainsi qu'une coiffe et une queue polyadenylée (Bartel, 2018). A ce stade, un complexe formé par les protéines Drosha, une endonucléase spécifique à l'ARN double brin de la famille des RNase III, et DGCR8, une protéine indispensable à la stabilisation de Drosha sur son substrat, vont permettre de cliver ces pri-miARN. Ce clivage se fait dans le noyau et donne naissance à un ARN intermédiaire d'environ 70 nucléotides, appelé le « pré-miARN » (Denli *et al.*, 2004 ; Gregory *et al.*, 2004). Les pré-miARN ainsi obtenus sont ensuite transportés dans le cytoplasme grâce à une interaction avec la protéine exportin-5 (Yi *et al.*, 2003 ; Lund *et al.*, 2004). Une fois dans le cytoplasme, les pré-miARN vont être pris en charge par Dicer, protéine qui va permettre l'hydrolyse de la structure boucle afin de produire des duplex doubles brins « miARN/miARN » d'une vingtaine de nucléotides. A partir de là, le complexe RISC, un complexe protéique effecteur (appelé miRISC lorsqu'il comprend un miARN) et composé notamment de protéines Ago, va prendre en charge les duplex miARN/miARN et permettre la séparation des doubles brins d'ARN. Le brin guide restera au sein du miRISC tandis que le brin passager sera dégradé. Après l'élimination du brin passager, le complexe miRISC s'associe à la séquence 3'UTR, et dans quelques cas à la séquence 5'UTR, de l'ARNm cible afin de réguler l'expression post-transcriptionnelle du gène (Brodersen and Voinnet, 2009).

La régulation de l'expression de l'ARNm cible va dépendre du type d'appariement entre le miARN et l'ARNm. Dans le cas d'un appariement parfait, retrouvé principalement chez les plantes, il y aura une dégradation totale de l'ARNm, alors que dans le cas d'un appariement imparfait, il y aura une inhibition de la traduction sans dégradation de l'ARNm (Bartel, 2009). Un des principaux déterminants de cet appariement est une séquence très conservée entre les espèces et, qui se situe entre les positions 2 et 7 de l'extrémité 5' du miARN appelée séquence « seed » (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). En effet, même si l'appariement des bases du miARN et de son ARNm cible n'est pas parfait, la séquence « seed » doit être parfaitement complémentaire. C'est cette propriété d'appariement, ne nécessitant pas de complémentarité parfaite, qui va permettre aux miARN de cibler un grand nombre de gènes et inversement, un même gène pouvant être la cible de plusieurs miARN.

4.1.2 Les miARN et la reproduction

Les premières études s'intéressant au rôle des miARN dans la fertilité féminine étaient principalement axées sur la suppression conditionnelle des différents gènes impliqués dans la biogenèse des miARN. Un des modèles les plus utilisés a été la souris KO pour DICER, protéine indispensable dans la biogenèse des miARN des voies canoniques et non canoniques (Bernstein *et al.*, 2003 ; Murchison *et al.*, 2007 ; Luense *et al.*, 2009 ; Lei *et al.*, 2010 ; Ha et Kim, 2014). Les études qui ont utilisé ce modèle ont montré que la perte de Dicer dans les cellules de la granulosa ovarienne, le tissu lutéal, l'ovocyte, et l'oviducte rend les femelles stériles. Les données obtenues à l'aide de ce modèle de souris KO ont apporté la première preuve de l'implication des miARN dans la reproduction. Depuis, le développement de technologies à haut débit tels que les micropuces ou le séquençage dédié aux petits ARN, a permis la caractérisation des miARN dans les tissus reproducteurs de nombreuses espèces (Liang *et al.*, 2007 ; Ahn *et al.*, 2010 ; Ling *et al.*, 2014), et abouti à la mise en évidence d'un certain nombre de miARN ovariens conservés d'une espèce à une autre (miR-21, miR-26, let-7, miR-143, miR-145, miR-378, miR-125).

Chez les mammifères, plusieurs études réalisées ces dix dernières années ont rapporté que certains de ces miARN ovariens joueraient un rôle dans le développement ovarien et dans l'activation des follicules précoces. Par exemple, le travail de Xu *et al.* chez le porc a montré l'implication du miR-378 dans la production d'E2 (Xu *et al.*, 2011). Ils ont rapporté, par des expériences *in vitro* de surexpression et d'inhibition, que l'expression de l'aromatase (cyp19a1), et donc la production d'E2 par les cellules de la granulosa, était régulée négativement par le miR-378. Dans une autre étude, Zhang *et al*. ont signalé l'implication de miR-376a dans la régulation des follicules primordiaux de souris néonatales (Zhang *et al.*, 2014). Ils ont montré que la surexpression du miR-376a dans les ovaires de souris en culture augmente le nombre de follicules contenant des ovocytes en pré-vitellogenèse et diminue l'apoptose des ovocytes. L'implication des miARN dans l'initiation des follicules a également été confirmée par l'enrichissement du miR-145 dans l'ovaire néonatal de souris, qui modifie l'expression des gènes de la protéine de liaison au sperme de la zone pellucide et active la voie de signalisation des TGF-β (Yang *et al.*, 2013). Plus récemment chez le porc, Li *et al.* qui ont montré le rôle du gène *Cyp19a1* dans la libération d'E2 et dans l'inhibition de l'apoptose des cellules de la granulosa, ont également découvert que miR-10b interagit directement avec le 3'-UTR de l'ARNm de C*yp19a1* en inhibant son expression et sa fonction dans la granulosa (Li *et al.*, 2018).

Chez les poissons, les données sur le rôle des miARN dans la reproduction restent assez rares. Elles sont principalement basées sur des études d'expression réalisées au cours du développement gonadique chez diverses espèces de poissons tel que la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*), le poisson-zèbre (*D. rerio*), le flétan de l'Atlantique (*H. hippoglossus*), le tilapia du Nil (*O.*

niloticus), la liche glauque (*T. Ovatus*) et le medaka (*O. latipes*) (Juanchich *et al.,* 2013 ; Wong *et al.,* 2018 ; Bizuayehu *et al.,* 2012 ; Xiao *et al.,* 2014 ; He *et al.,* 2019 ; Qiu *et al.,* 2018). Parmi ces études, certaines ont permis d'identifier des miARN ovariens pouvant être impliqué dans le développement folliculaire. Chez le poisson-zèbre, Abramov *et al.* ont caractérisé l'expression et la régulation de deux miRNA, miR-17a et miR-430b, ciblant potentiellement les molécules de signalisation dans la voie du TGF-β, dans les follicules ovariens (Abramov *et al.*, 2012). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'un traitement avec un analogue de la LH, la gonadotrophine chorionique humaine permet de réguler significativement et négativement l'expression de miR-17a et miR-430b dans les cellules folliculaires mais qu'il n'a aucun effet sur leur expression dans les ovocytes. Les auteurs de cette étude concluent que miR-17a et miR-430b pourraient être impliqués dans la régulation du développement folliculaire et de la maturation des ovocytes.

En ce qui concerne le médaka, deux études ont permis d'identifier des miRNA exprimés de façon spécifique ou prédominante dans les gonades (Bouchareb *et al.*, 2017 ; Qiu *et al.*, 2018). Dans la première étude, Bouchareb *et al.* ont réalisé une analyse transcriptomique par une approche différentielle de puce à miARNs (ou « microarray ») et ont mis en évidence 66 miARN présentant une expression à prédominance ovarienne. Parmi ces candidats, 10 miARN avaient été précédemment identifiés dans l'ovaire ou la lignée germinale chez la souris et 1 miARN (miR-202) avait déjà été montré comme spécifique des gonades chez les poissons et chez les mammifères (Ahn *et al.,* 2010 ; Juanchich *et al.,* 2013). La seconde étude, parue au cours de l'avancement de ce projet, a été réalisée à partir du séquencage des petits ARN issus des gonades. Dans ce travail, Qiu *et al.* ont mis en évidence 285 miARN conservés et 388 nouveaux miARN, dont 3 sont exprimés spécifiquement dans les gonades (miR-430c, miR-26a et miR-202-5p). Enfin, ils ont montré que le miR-202-5p était présent tout au long de la spermatogenèse et n'était détecté qu'aux cours des premiers stades de l'ovogenèse.

4.2 Les piRNA

Les piRNA (ARN interagissants avec les protéines PIWI) sont des petits ARNnc simples brins de 24 à 32 nucléotides qui ont la capacité de se lier aux protéines ARGONAUTES de la sous-famille PIWI.

Initialement, la fonction connue des piRNA était restreinte à la régulation des éléments transposables (TE) au niveau des gonades. Ces séquences répétées présentes dans le génome sont mises sous silence par ces petits ARN permettant ainsi de protéger l'information génétique transmise à la descendance. La première étude à avoir mis en évidence cette fonction, a été réalisée en 2001 sur des testicules de *D. melanogaster* (Aravin *et al.*, 2001). Les auteurs ont trouvé une forte abondance de ces petits ARN, d'une taille plus importante que celle des siARN et miARN (soit 23-32 nt), dans les organes sexuels et dans l'embryon de la drosophile. Ces ARN dérivés de

séquences d'éléments répétés dans le génome furent alors nommés dans un premier temps « repeat-associated small interfering RNA » ou rasiARN. C'est seulement cinq ans plus tard, lors d'une étude d'immunoprécipitation d'une des protéines PIWI dans les testicules de souris adultes, que cette nouvelle classe d'ARN fut renommée piARN (Aravin *et al.*, 2006). Lors de cette étude, Aravin *et al.* ont également observé qu'une grande partie de ces piARN étaient générés à partir de séquences de TE et ciblaient les ARNm de ces mêmes TE. Par la suite, de nombreuses autres études ont validé ce travail et ont proposé que les piARN jouaient un rôle important dans la protection du génome contre l'invasion des TE dans les cellules germinales de nombreuses espèces (Aravin *et al.*, 2007 ; Brennecke *et al.*, 2007 ; Ernst *et al.*, 2017).

Dès 2006, d'autres études ont mis en évidence des piARN sans aucun rapport avec les TE, comme dans l'étude de Grivna *et al.* où il ont identifié une sous-population de piARN, exprimés lors de la spermatogenèse chez la souris, et non liée aux séquences répétées (Grivna *et al.*, 2006). Ainsi, ils ont proposé que ces piARN pouvaient avoir une autre fonction biologique que la protection du génome et pouvaient être des régulateurs de l'expression des gènes. Au fil des ans, les piARN n'ayant pas de complémentarité avec les TE, ont été retrouvés en quantité non négligeable au sein des gonades de nombreuses espèces telles que le singe, le rat, l'homme, …(Hirano *et al.*, 2014 ; Lau *et al.*, 2006 *;* Williams *et al.*, 2015). Les preuves d'une fonction de ces piARN dans la régulation de l'expression des gènes ont ensuite commencé à s'accumuler (Robine *et al.*, 2009 ; Goh *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2015). A l'heure actuelle, les résultats obtenus indiquent que, comme dans le cas des miARN, l'appariement des piARN avec les ARNm peuvent conduire à la répression par le biais de différents mécanismes : la déadénylation ou le clivage endonucléolyse dépendante de PIWI, en fonction du niveau de complémentarité des séquences de piARN avec leurs cibles (Rojas-Rıós et Simonelig, 2018). Enfin, deux études indépendantes récentes proposent que la régulation post-transcriptionnelle des gènes par les piARN serait une fonction ancestrale des piARN (Praher *et al.*, 2017 ; Lewis *et al.*, 2018).

4.2.1 Biogenèse des piARN

Les piARN sont retrouvés au sein des gonades de nombreuses espèces animales telles que la drosophile, le ver, la souris, l'homme et le poisson-zèbre (Saito *et al.*, 2006 ; Brennecke *et al.*, 2007 ; Ashe *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2013 ; Yang *et al.*, 2013 ; Houwing *et al.*, 2007). Les analyses bio-informatiques basées sur ces données ont révélé que les séquences des piARN ne sont pas conservées d'une espèce à une autre, contrairement aux miARN (Sarkies *et al.*, 2015). En revanche, le processus de production des piARN est assez semblable d'une espèce à l'autre et se fait, de façon générale, par deux voies distinctes de biogenèse, la voie dite « primaire » et la voie dite « secondaire » ou « cycle ping-pong » (figure 7).

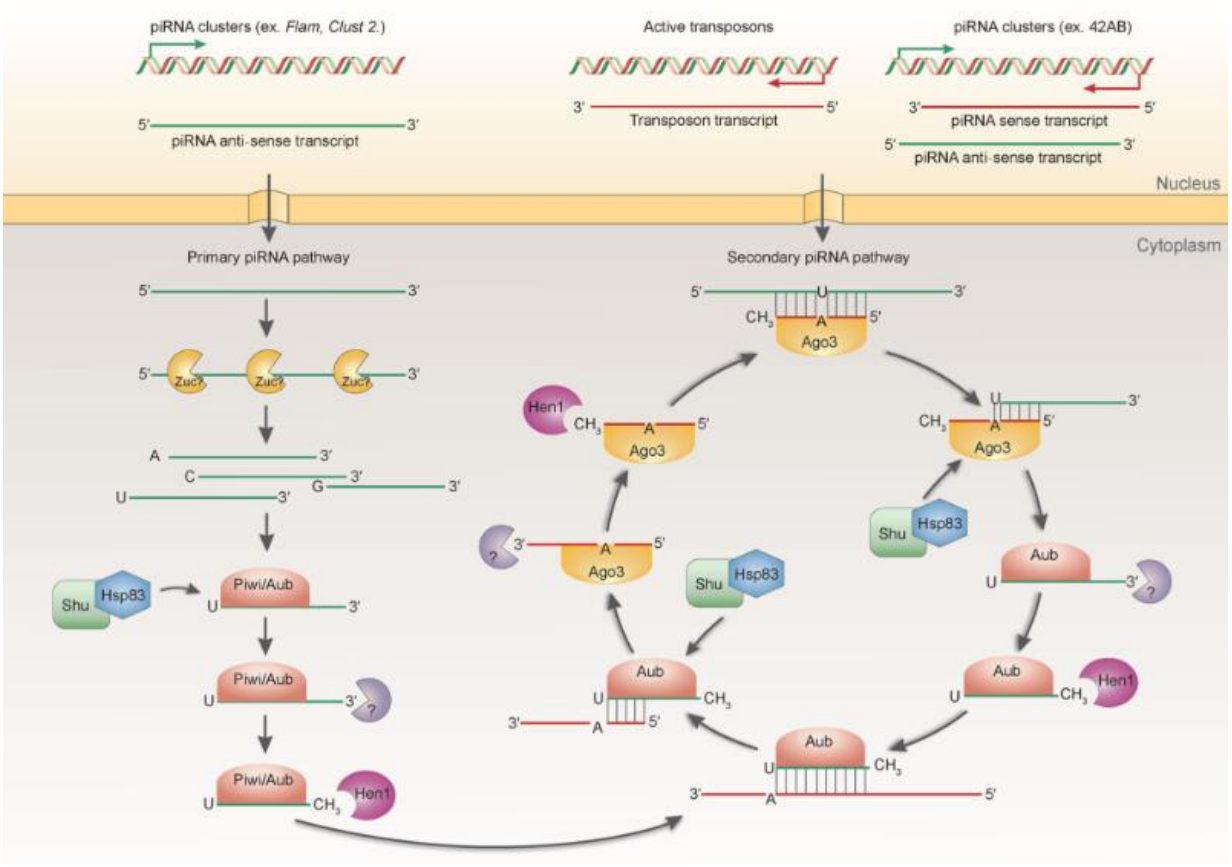


Figure 7 : Biogenèse des piARN. Les deux voies de biogénèse des piARN : voie primaire et voie secondaire (cycle ping-pong) (Ku et Lin, 2014).

Les piRNA peuvent être produits par la voie de biogenèse dite « primaire », active aussi bien dans les cellules somatiques que dans les cellules germinales. La production des piARN est alors initiée par la transcription d'un groupe de piARN appelé « cluster », pour donner un long piARN précurseur simple brin. Dans un second temps, ce long transcrit est clivé donnant ainsi des piARN de tailles réduites (24 à 32 nt) qui sont alors chargés sur l'une des protéines de la sous famille PIWI (Kawaoka *et al.*, 2011). A ce stade, la protéine PIWI est responsable d'un biais de sélection des candidats en aboutissant à des piARN primaires présentant plus fréquemment une Uridine (U) en 5', signature de ce processus « primaire ». L'autre extrémité (3') est ensuite coupée jusqu'à atteindre une région de l'ARN protégée par l'empreinte de la protéine PIWI. On retrouve ainsi des piARN de longueurs différentes en fonction de la protéine PIWI qui interagit avec le piARN. Enfin, les piARN primaires subissent une étape de méthylation de leur extrémité 3' par HEN1 (HUA *enhancer* 1), modification censée les protéger d'une dégradation précoce (Kamminga *et al.*, 2010). Le piARN mature, appelé piARN primaire, peut alors guider, par appariement total ou partiel, la protéine PIWI sur l'ARNm du TE ciblé ou peut s'engager dans la seconde voie de biogénèse.

La seconde voie de biogenèse des piARN, dite « secondaire » ou « cycle ping-pong », a été décrite comme une voie d'amplification exclusivement germinale. A l'issue de la voie de biogénèse primaire, le piARN primaire mature s'apparie à l'ARNm du TE actif (brin sens ou antisens) puis est pris en charge par la protéine PIWI. Cette dernière clive la cible, donnant naissance à l'extrémité 5' d'un nouveau piARN, dit secondaire. Le clivage s'effectue toujours au même endroit, au niveau du nucléotide qui s'apparie avec le 10^{eme} nucléotide du piARN. Par conséquent, le piARN secondaire présente deux signatures : d'une part, sa séquence est complémentaire de celle du piARN primaire sur les 10 premiers nucléotides et, d'autre part, l'enrichissement en piARN affichant une Uridine (U) en 1^{re} position se traduit dans les piARN secondaires par un enrichissement en Adénosine (A) en position 10. Le piARN secondaire est ensuite reconnu par une autre protéine PIWI puis maturé et modifié à son extrémité 3', de la même façon que le piARN primaire. Le nouveau complexe piARN secondaire / protéine PIWI agit alors sur un nouveau précurseur de piARN et le clive au niveau du A en position 10. Ce clivage créé un U en position 1 du 5', générant ainsi un nouveau piARN dont la séquence est identique au piARN primaire, et ainsi de suite. Grâce à ce cycle, une cellule peut rapidement produire une grande quantité de piARN ciblant un transposon bien particulier. Cette réponse amplifiée peut alors compenser la production rapide d'éléments transposables, pouvant être causée par exemple par un stress passager de l'organisme.

4.2.2 Les régulateurs de la gamétogenèse

Ces dernières années, les données obtenues ont mis la lumière sur une nouvelle notion selon laquelle les piARN et leurs protéines associées pourraient également réguler post-transcriptionnellement des gènes cibles en diminuant le taux de leurs transcrits, *via* un mécanisme similaire à celui utilisé par les miARN. Cependant, les études mettant en évidence cette régulation post-transcriptionnelle lors de la gamétogenèse sont peu nombreuses.

Une des premières études qui a démontré l'implication des piARN dans la régulation des gènes est la régulation de l'ARNm de *Stellate* (*Ste*) par le suppresseur de Stellate (*Su(Ste)*), dans les testicules de drosophile (Aravin *et al.,* 2001). STE est une protéine similaire à la sous-unité β de la caséine kinase II qui, lorsqu'elle est présente dans le testicule, forme des agrégats de longue durée affectant la spermatogenèse et pouvant conduire à la stérilité des animaux. Dans ce système, il a été montré que *Su(Ste)* produit des niveaux élevés de piARN complémentaires à l'ARNm de *Ste*, réprimant ainsi son expression et permettant la spermatogenèse de se faire correctement (Kotelnikov *et al.*, 2009).

Plusieurs autres études indépendantes se sont intéressées aux piARN lors de la spermatogenèse chez la souris, et ont mis en évidence cette régulation de gènes par les piARN (Aravin *et al.,* 2006 ; Carmell *et al.,* 2007 ; Shoji *et al.,* 2009 ; Robine *et al.,* 2009 ; Reuter *et al.,* 2011 ; Beyret *et al.,* 2012 ; Larriba et del Mazo, 2018). Ils ont montré qu'il y avait deux types de piARN dans les testicules de souris : les piARN prépachytènes (produits à partir de séquences TE) et les piARN pachytènes (indépendant aux TE et générés à partir de séquences non répétitives et d'ARNm endogènes). Ils ont pu déterminer que les piARN prépachytènes, présents dans les cellules germinales dans la gonade mâle avant la naissance et pendant la période néonatale, ont une fonction de protection du génome en régulant les TE, tandis que les piARN pachytènes interviendraient plus tardivement, lors de la différenciation des spermatides ronds et de l'élongation des spermatides, et assureraient un rôle de régulateur post-transcriptionnel des gènes intervenants à ces stades. Plus récemment, d'autres chercheurs ont classé ces deux types de piARN dans les gamètes et les zygotes de souris, et montré que les piARN indépendants des TE nommés « NRapiRNA » (ou Non-Repeat associated piRNA) étaient plus petits que ceux nommés « RapiRNA » (ou Repeat associated piRNA), avec une taille d'environ 25 nucléotides, et qu'ils été retrouvés préférentiellement au niveau des 3' et 5'UTRs des ARNm codants (Larriba et del Mazo, 2018).

Enfin, chez les bovins, S. Russell *et al.* ont également identifié un grand nombre d'ARN de type piRNA (nommés ARN-pil) légèrement plus court, entre 24 et 27 nucléotides, dans des pools d'ovocytes et de zygotes. Ils ont identifié qu'une partie de ces ARN-pil sont associées à des gènes (Russell *et al.,* 2016).

Chez les poissons, les piARN et leurs protéines associées n'ont été que très peu étudiés. Les seules études disponibles à l'heure actuelle portent principalement sur l'expression de ces ARN dans les gonades, chez différentes espèces de poissons tels que le poisson-zèbre, le médaka, le cardeau hirane et l'esturgeon (Zhou *et al.*, 2010 ; Kneitz *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016 ; Yuan *et al.*, 2019). Et à ce jour, aucune étude n'a démontré l'implication directe de ces piARNs dans la régulation des gènes de la gamétogenèse chez le poisson.

5. Objectif de ce travail

Au cours des dernières décennies, et comme illustré dans cette introduction, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'ovogenèse des vertébrés ont été largement étudiés. Lorsque nous avons débuté ce travail, le contrôle génétique et hormonal du développement folliculaire était relativement bien décrit chez les poissons, en revanche l'implication des petits ARNnc dans ces mécanismes cellulaires n'était alors qu'une hypothèse. Afin d'étayer cette hypothèse, nous nous sommes donc intéressés à l'expression et à la fonction des miARN et des piARN au cours de l'ovogenèse chez le médaka.

Dans une première partie, l'objectif était d'identifier **les miARN et les piARN** exprimés dans l'ovaire **chez le médaka et potentiellement impliqués dans le contrôle de l'ovogenèse. Pour cela, nous avons émis** l'hypothèse que des ARNnc exprimés spécifiquement (ou de façon très fortement préférentielle) dans l'ovaire pourraient jouer un rôle important dans la régulation de l'ovogenèse, comme c'est le cas pour les gènes à protéines. Grâce à une analyse transcriptomique réalisée à partir d'un grand nombre de tissus, nous avons **identifiés des ARNnc candidats dont l'expression est spécifiquement ovarienne ou prédominante dans l'ovaire.**

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à un candidat obtenu à l'issue de l'analyse des profils d'expression des ARNnc, le miR-202. Nous avons cherché à **déterminer son rôle dans le développement de l'ovaire chez le médaka** en réalisant une analyse fonctionnelle *in vivo* par inactivation génique (KO).

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Elevage des médaka

Les procédures expérimentales ont été réalisées dans le respect de la règlementation Française et Européenne sur le bien-être animal, et approuvées par la structure bien être du LPGP. Les medaka juvéniles et adultes de la souche CAB ont été élevés à 26˚C.

Génotypage

L'ADN génomique a été extrait d'un morceau de la nageoire caudale prélevée sur des médaka adultes anesthésiés. Les morceaux de nageoire ont été lysés dans 75 µl de tampon de lyse contenant 1,25 M NaOH et 10 mM EDTA (pH 12) incubés à 90°C pendant 1 heure. Puis ils ont été neutralisés avec 75 µl de solution de neutralisation contenant 2 M de Tris-HCl (pH 5). Pour l'identification des poissons fondateurs F0, l'ADN génomique a été séquencé autour du site de mutation attendu. Pour le génotypage systématique des individus de la lignée établie, les allèles de type sauvage et mutants ont été spécifiquement détectés par HIDI-PCR en utilisant des amorces spécifiques pour chaque allèle. La polymérase HIDI a été utilisée avec les conditions de PCR suivantes : 95°C pendant 2 minutes ; et 40 cycles de 95°C pendant 20 secondes, 57°C pendant 15 secondes, 72˚C pendant 30 secondes ; puis 72˚C pendant 7 minutes.

Récolte des œufs

Les médaka adultes ont été placés en couple dans la zone de reproduction afin de récupérer les œufs quotidiennement. Des femelles et des mâles sauvages ont été croisés entre eux afin de servir de contrôle. Des femelles et des mâles mutés miR-202-/- ont été croisés pour analyser l'effet de l'absence du miR-202 sur la reproduction du médaka. Des femelles mutées ont également été croisées avec des mâles sauvages et des mâles mutés avec des femelles sauvages pour déterminer plus précisément l'effet provenant du mâle ou de la femelle. Les œufs ont été collectés pendant 10 jours pour étudier la fréquence de ponte, le nombre d'œufs pondus, le nombre d'œufs vivants au moment de la récolte, et leur développement jusqu'à éclosion.

Prélèvement des tissus

Les prélèvements d'organes et de tissus ont été réalisés sur des poissons adultes euthanasiés par immersion dans une dose létale de tricaïne. Onze différents tissus de medaka adultes (cerveau, œil, nageoires, branchies, cœur, intestin, rein, foie, muscle, ovaire, testicule), de follicules ovariens de différentes catégories (st.I-IV, st.V-VI, st.VII, st.VIII et st.IX) et d'embryons à différents stades de développement (st.0, st.2, st.5, st.15, st.27, st.31, st.35, st.39) ont été prélevés (Iwamatsu *et al.*, 1988 ; Iwamatsu, 2004 ; Annexe 1).

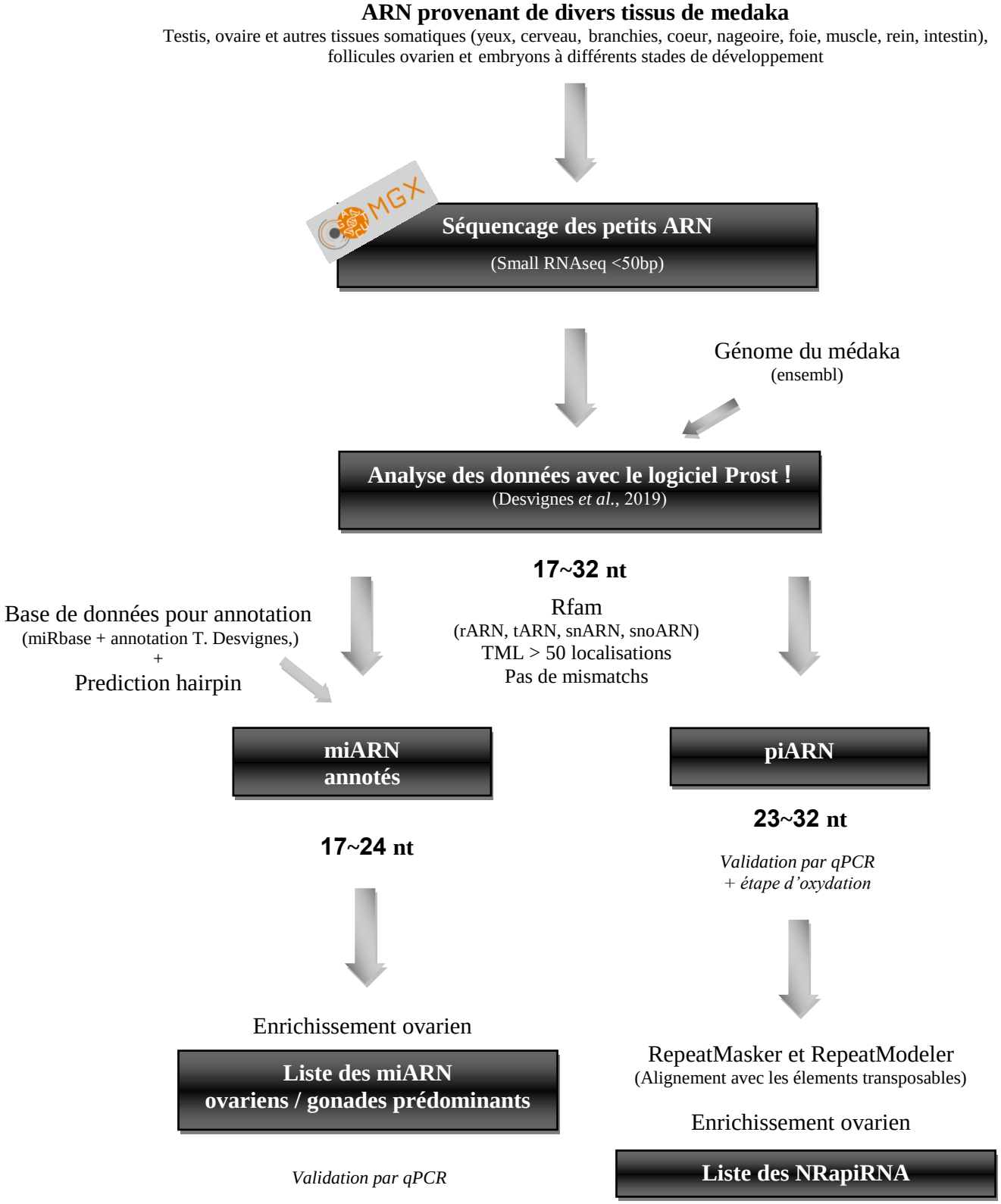


Figure 8 : Worflow de l'analyse des données issues du séquencage (small RNAseq).

Les prélèvements utilisés pour le séquençage des petits ARN ou pour l'analyse de leur expression, ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80˚C jusqu'à l'extraction de leurs ARN. Tandis que les prélèvements utilisés pour les analyses histologiques ont été fixés une nuit à 4°C dans du paraformaldéhyde (PFA) 4%, déshydratés dans du méthanol à 100% et stockés à -20˚C.

Extraction des ARN totaux

Les tissus congelés ont été lysés avec l'homogénéisateur Precellys Evolution (technologies Ozyme, bertin) dans le réactif TRI Reagent (TR118, Euromedex) et les ARN totaux ont ensuite été extraits avec le kit "nucleospin RNA" (740955, Macherey Nagel).

Séquençage des petits ARN non codants

Le séquençage a été effectué à partir des ARN des onzes tissus et des différents stades de développement embryonnaire et folliculaire prélevés chez le médaka. Un seul échantillon biologique a été utilisé pour chaque tissu. Pour les stades de développement, plusieurs embryons et follicules ont été mis en commun avant l'extraction de l'ARN. Vingt-quatre bibliothèques ont été construites en utilisant le « NEXTflex small RNA-seq kit V3 » (Bioo Scientific). En partant de 1µg d'ARN totaux, des adaptateurs ont été ajoutés aux l'extrémité 3' et 5' des ARNs. Ces ARN modifiés ont ensuite été soumis à une reverse transcription en utilisant la transcriptase M-MuLv et une amorce RT complémentaire à l'adaptateur 3'. Une amplification par PCR (16 cycles) a été effectuée sur l'ADNc en utilisant une amorce universelle et une amorce avec code à barres. La sélection finale de la taille a été effectuée sur un gel à 3% sur un Pip- pin HT entre 126pb et 169pb. Le séquençage (lecture unique de 50 nucléotides) a été réalisé en utilisant une technique HiSeq2500 (Illumina) avec SBS (Sequence By Synthesis).

Analyse des données

L'analyse des données a été réalisée par Jérôme Montfort au sein de notre laboratoire en utilisant le logiciel Prost ! (Processing of short transcripts) (figure 8, Desvignes *et al.*, 2019). Les données obtenues à l'issue du séquencage ont tout d'abord été nettoyées par une étape de filtration afin d'enlever les séquences correspondantes aux adaptateurs. A partir de là, une première analyse a été réalisée avec le logiciel prost ! afin d'obtenir les séquences des ARNnc d'une taille comprise entre 17 et 32nt. Seules les séquences s'alignant à 100% sur le génome ont été gardées (aucun mismatch autorisé) et avec une limite de 30 lectures totales minimum. Enfin, une étape permettant d'enlever d'autres petits ARN tels que les tARN, rARN et snARN a été réalisée en utilisant la base de données Rfam.

A partir de ces données, une seconde selection permettant d'obtenir des séquences entre 17 et 24 nt, correspondant à la taille des miARN, a été réalisée. Le logiciel prost ! identifie et l'annote les miARN, en utilisant la base de données « miRbase » (www.mirbase.org) ainsi qu'une correction de l'annotation réalisée par Thomas Desvignes.

Une dernière analyse, permettant d'obtenir des séquences d'une taille comprise entre 23 et 32nt, correspondant aux piARN a été réalisée. Une étape permettant d'enlever les miARN annotés restants ainsi que les séquences avec plus de 50 localisations dans le génome a été ajoutée. Enfin, l'utilisation de RepeatMasker et RepeatModeler a permis d'obtenir le positionnement des TE et des éléments répétables.

RT-PCR quantitative

Pour l'analyse de l'expression des ARNnc (miARN et piARN), une RT spécifique aux petits ARN, permettant l'ajout d'aptateurs, suivi d'une qPCR, avec des sondes taqman spécifiques de chaque ARNnc, a été réalisée. Pour cela, 50 ng de l'ARN total ont été reverse transcrits (RT) à l'aide du kit de synthèse d'ADNc « TaqMan advanced miRNA cDNA Synthesis Kit» (A28007, Applied Biosystems). Un calibrateur externe cel-miR-39-3p à 20 fmol.µl-1 (478293_miR, Life technologies) a été ajouté dans la première étape de la RT TaqMan advanced (étape polyA). Après l'étape de reverse transcription, une petite amplification par PCR (16 cycles) a été réalisée sur l'ADNc. Puis, l'ADNc a été dilué (1:5) et des amorces universelles (20x miR-Amp Primer Mix, 100029187, Applied Biosystems) ont été ajoutées dans la dernière étape de la réaction RT. La PCR quantitative a ensuite été réalisée en utilisant 5 µl d'ADNc dilué, 1 µl de sonde « TaqMan Advanced miRNA Assay » (CCU001S, Special Product designed advanced miRNA assay, Life technologies) et 10 µl de Master Mix Fast Advanced (4444557, Applied Biosystems) pour un volume total de 20 µl final. Les sondes spécifiques modifiées ont été conçues comme suit : 5'FAM-n20-3'Quencher (Life technologies). La PCR quantitative a été réalisée à l'aide du système Step One Plus (Applied Biosystems, USA) dans les conditions suivantes : 95˚C pendant 20 secondes ; et 40 cycles de 95˚C pendant 1 seconde et 60˚C pendant 20 secondes. L'expression relative des ARNnc des différents échantillons a été calculée à partir d'une courbe standard en utilisant le logiciel Applied Biosystem StepOne V.2.0. Toutes les qPCR ont été effectuées en duplicats. Le Cel-miR-39-3p a été utilisé pour la normalisation.

Pour l'analyse de l'expression des ARNm, une RT plus classique suivi d'une qPCR avec du sybergreen ont été effectués. La reverse transcription a été réalisé avec l'enzyme maxima pour obtenir les ADNc suivi d'une PCR quantitative (Sybergreen). Pour cela, 2 µg de l'ARN total a été reverse transcrit à l'aide du kit de synthèse d'ADNc « Maxima First Strand » (K1671, ThermoFisher Scientific). L'ADNc obtenu a été dilué au 1:20. Puis, 4 µl d'ADNc dilué, 5 µl de PCR Master Mix

2x (A600A, Promega) et 10 µM de chaque primer, ont été utilisés pour la qPCR (volume total de 10 µl). La qPCR a été réalisée en utilisant le système Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, USA) dans les conditions suivantes : 95˚C pendant 2 minutes ; et 40 cycles de 95˚C pendant 15 secondes et 60˚C pendant 1 minute. Les courbes standard ont été générées en utilisant cinq dilutions d'ADNc en série (de 1:2 à 1:32) d'un pool de tous les échantillons. L'abondance relative de l'ADNc cible a été calculée à partir de la courbe standard en utilisant le logiciel Applied Biosystem StepOne V.2.0. Toutes les qPCR ont été réalisées en triplicats et le gène rpl7 a été utilisé pour la normalisation. Pour l'analyse de ces résultats des diagrammes en boîtes ont été utilisés pour faire les graphiques et un test de Mann Whitney a été réalisé (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$, test de Mann).

Hybridation *in Situ*

Pour l'hybridation *in situ* à fluorescence (FISH), les ovaires de poissons adultes fixés ont été incorporés dans la paraffine et des sections de 9 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome (HM355, microm). Un oligonucléotide d'acide nucléique bloqué (LNA) anti-sens a été conçu et produit par Exiqon A/S pour détecter les ARNs non codants. Une sonde LNA Scramble-miR (5'-GTGTAACACGTACGTATACGTACGCCCA-3') a été utilisée comme sonde négative. Toutes les sondes LNA ont été marquées double DIG aux extrémités 5' et 3'. La FISH a été effectué à l'aide du tampon d'hybridation (réf. 90000, Exiqon) du microRNA ISH Buffer Set (FFPE), en suivant les instructions du fabricant avec quelques modifications. La perméabilisation a été effectuée pendant 7 minutes à température ambiante à l'aide de Protéinase-K (10 mg/ml, P2308 Sigma). Les sondes LNA ont été utilisées à 20 nM et hybridés à 53˚C (30˚C de moins que le Tm de l'ARN) pendant 2 h. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant la nuit sur 4˚C avec un anticorps conjugué anti-DIG HRP de lapin (1:500, Roche). L'anticorps anti-DIG-HRP a été détecté avec le substrat TSA-Cy5 (1:50, kit TSA PLUS Cy5, NEL 745001KT, Perkin Elmer) pendant 15 minutes à température ambiante. Toutes les photos ont été prises au microscope confocal SP8.

Oxydation

L'étape d'oxydation a été réalisée par un traitement avec du NaIO4 à partir d'ARN extraits de 6 ovaires de médaka adultes (Kneitz *et al.*, 2016). Pour cela, une fraction d'ARN totaux (400 ng) a été incubée pendant 30 minutes avec 25 mM de NaIO4 fraîchement préparé dans un tampon borate (50 mM de tétraborate de sodium décahydraté et 50 mM d'acide borique; pH 8,6) dans un volume final de 40 µl. Ensuite, 30 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 1 µl de glycogène ont été ajoutés. Les ARN ont été précipités à -70 °C pendant 1 h, puis le précipité a été recueilli par centrifugation et redissous dans un volume de 10µl d'eau sans RNase.

Marquage nucléaire et analyse d'image

Les marquages nucléaires ont été réalisés sur des ovaires fixés de poissons sauvages et mutants miR-202-/-. Les ovaires ont ensuite été inclus dans de la paraffine puis coupés à 7 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (HM355, microm). Seules les sections médianes des ovaires ont été conservées pour une analyse plus poussée. Les noyaux ont été marqués avec 0,1 $\mu g.ml^{-1}$ de DAPI (marqueur nucléaire) à température ambiante pendant 15 minutes dans l'obscurité. Les sections ont été lavées 1 heure dans du PBS à température ambiante. Des images de sections entières ont été acquises avec d'un scanner de lame (HAMAMATSU) sur une plateforme d'histologie de Rennes « H2P2 ». Pour l'analyse quantitative d'images, les noyaux des cellules somatiques entourant chaque ovocyte (marqués au DAPI) ont permis de délimiter tous les follicules et de les visualiser automatiquement en utilisant une procédure de segmentation automatique à l'aide du logiciel Visilog 7.2. Ce système a permis de quantifier la surface des sections, la surface des ovocytes ainsi que leur nombre par section. La distribution de la taille des follicules a également été analysée permettant de les classer selon leur diamètre. Pour l'analyse de ces résultats des diagrammes en boîtes ont été utilisés pour faire les graphiques et un test de Mann Whitney a été réalisé (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$, test de Mann).

RESULTATS

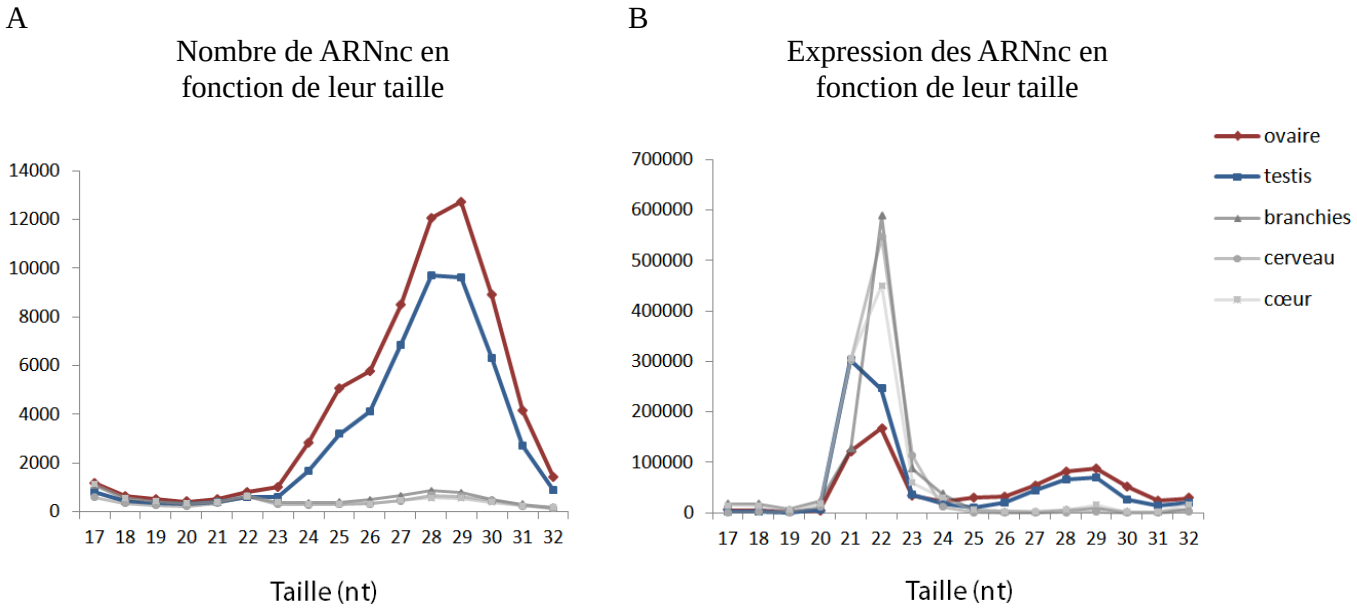


Figure 9 : Distribution des ARNnc dans différents tissus du médaka. (A) Le graphique représente le nombre de séquences de ARNnc en fonction de leur taille. (B) Le graphique représente la répartition des lectures des ARNnc en fonction de leur taille (rouge et bleu : gonades, gris : autres tissus).

PARTIE I : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES ARN NON CODANTS OVARIENS IMPLIQUES DANS L'OVOGENESE

La première étape de ce travail a été de caractériser les ARNnc chez le médaka par une approche par séquencage à haut débit puis, d'identifier les miARN et piARN présentant un profil ovarien-spécifique ou prédominant.

1. Vue d'ensemble des petits ARN non codants chez le médaka

Dans un 1er temps nous avons extrait les ARN totaux de 24 échantillons représentant 11 tissus (yeux, cerveau, branchies, cœur, nageoire, foie, muscle, rein, intestin, testis et ovaire), des follicules ovariens et des embryons à différents stades de développement. Nous avons ensuite réalisé une analyse transcriptomique par séquencage sur ces 24 échantillons afin d'identifier les petits ARNnc présents chez le médaka. A l'issue du séquencage, les données ont été traitées et analysées avec le logiciel Prost !. Ce logiciel, déjà utilisé pour étudier les miARN dans des espèces tels que l'épinoche (*G. aculeatus*) et le poisson-zèbre, permet l'alignement des séquences contre le génome, puis la quantification des ARNnc (Desvignes *et al.*, 2019). Pour avoir une première vue d'ensemble des petits ARNnc chez le médaka nous avons paramétré le logiciel prost ! de façon à obtenir uniquement les séquences d'une taille comprise entre 17 et 32 nt.

Nous avons obtenu 112 772 séquences différentes pour un total de 132 788 117 lectures. La distribution des séquences et de leurs lectures en fonction de la taille a mis en évidence un profil très différent entre les tissus somatiques et les gonades (figures 9A et B). En ce qui concerne les tissus somatiques, nous avons observé un pic entre 20 et 24 nucléotides montrant une légère augmentation du nombre de séquence (figure 9A, en gris), pour un nombre de lecture élevé (figure 9B, en gris). En revanche, en ce qui concerne les gonades, nous avons retrouvé le 1er pic autour de 22 nucléotides mais également un 2nd pic plus étalé entre 23 et 32 nucléotides, avec un nombre de séquences très élevé (figure 9A, rouge et bleu) mais un nombre de lecture beaucoup plus faible que pour le 1er pic (figure 9B, rouge et bleu).

Cette première analyse met en évidence deux populations d'ARN non codants de tailles différentes chez le médaka, l'une correspondante à la taille attendue des miARN (17-24 nt) et l'autre correspondante à celle des piARN (23-32 nt), connus pour leur expression principalement dans les cellules germinales (Klattenhoff and Theurkauf 2008). De plus, ces données montrent que, bien que moins nombreux, les miARN ont des niveaux d'expressions beaucoup plus élevés que les piARN.

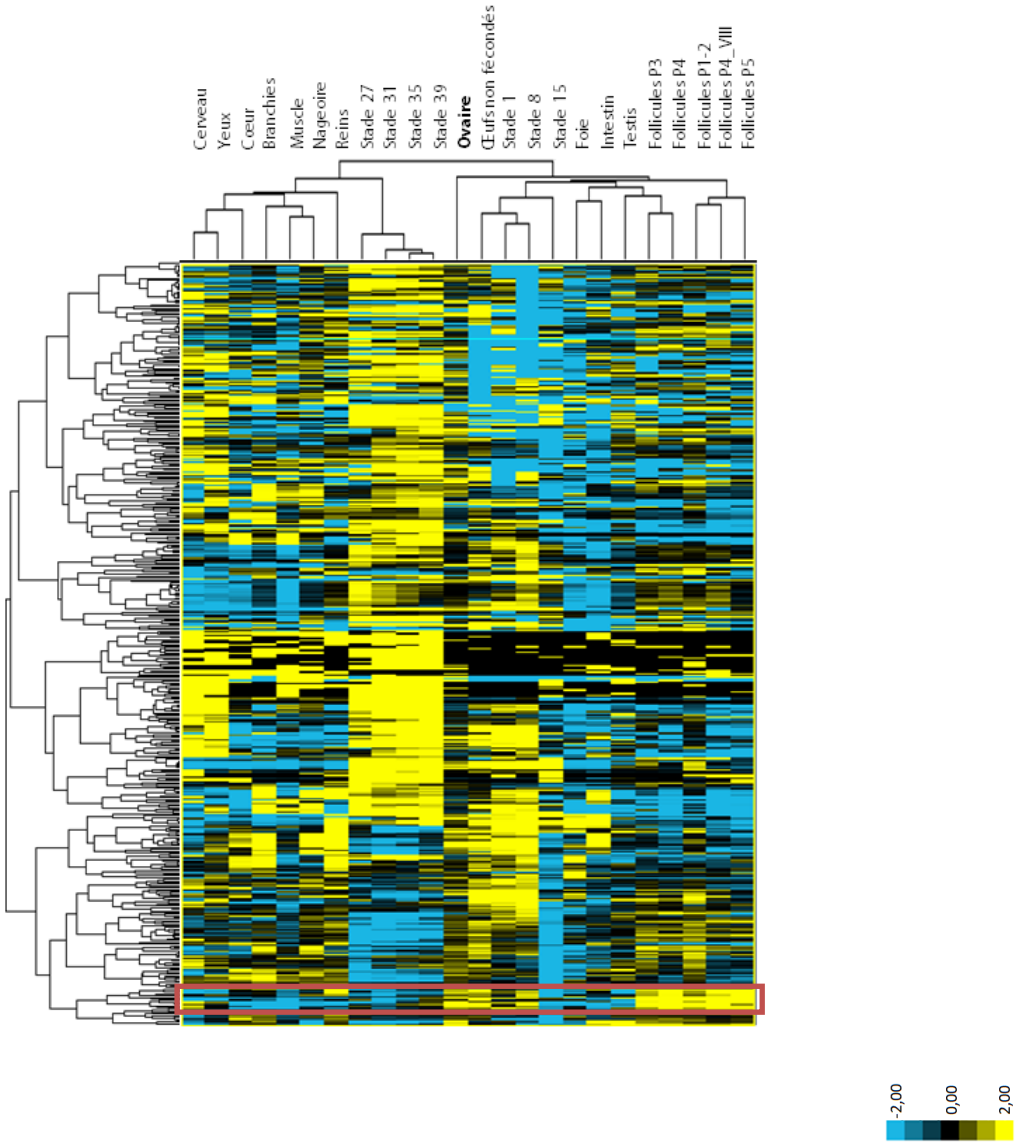


Figure 10 : Distribution des miARN dans les différents tissus du médaka. Analyse des miARN exprimés de façon différentielle. Chaque ligne représente une séquence unique de miARN et chaque colonne représente un échantillon de tissu. Plusieurs miARN sont retrouvés avec une expression principalement dans l'ovaire et les follicules (encadré rouge). Les niveaux d'expression sont indiqués à l'aide d'une échelle de densité de couleur. Le jaune et le bleu sont utilisés pour la surexpression et la sous-expression, respectivement. Le noir est utilisé pour l'expression médiane.

Séquence	Annotation	Ovaire	Testis	Enrichissement dans l'ovaire	Localisation
TTCCTATGCATATACTTCTTT	ola-miR-202-5p	**207827,27**	216139,53	2243,47	15:2820142-2820122
TCGTGTCTTGTGTTGCAGCCAGT	ola-miR-187-3p	**1396,84**	5,41	16,27	11:8753772-8753794
AGAGGCATAAGGCATGGGAAA	ola-miR-202-3p	**655,32**	588,12	2309,74	15:2820106-2820086
TTACAATTAAAGGATATTTCTG	ola-miR-7552b-5p	**432,49**	25,08	15,26	19:24697834-24697813
GGCTGCAACACAGGACATGG	ola-miR-187-5p	**340,44**	0,49	53,48	11:8753732-8753751
AATGTCTTTTAATTGTTTGGT	ola-miR-7552b-3p	**37,26**	6,39	18,50	19:24697800-24697780

Tableau 1 : Liste des 6 miARN les plus exprimés dans l'ovaire, avec un enrichissement dans l'ovaire > 5 et un nombre de lectures dans l'ovaire > 10.

2. Caractérisation des miARN dans l'ovaire du médaka

Afin de pemettre l'étude plus spécifique des miARN, nous avons paramétré le logiciel Prost ! de façon à obtenir des séquences comprises entre 17 et 24 nucléotides. Lors de cette analyse un système de reconnaissance des miARN, utilisant la base de données « miRbase » (www.mirbase.org), a permis l'identification et l'annotation des miARN retrouvés dans les autres espèces.

Avec ces paramètres, nous avons identifié 458 miARN matures annotés avec un nombre total de 97 316 664 lectures. Ces 458 miARN sont issus de 283 génes de miARN, dont 70% ont une localisation unique sur le génome. L'analyse du profil de distribution de ces miARN dans les différents tissus montre que la plupart des miARN sont exprimés dans un seul tissu ou dans un sous-ensemble de tissus (figure 10). De plus, le profil d'expression obtenu par prost ! de certains miARN est cohérent avec celui retrouvé dans la littérature, ce qui nous permet de nous conforter avec notre jeu de données. Par exemple, les miR-430 exprimés principalement au cours de l'embryogénèse, du début de l'épibolie jusqu'à la formation de l'axe (Saori Tani, 2010). Enfin, le profil de distribution des 458 miARN dans les tissus met en evidence la présence de miARN ovariens et folliculaires chez le médaka (figure 10, encadré rouge).

2.1 Identification des miARN gonadiques et ovariens prédominants

Afin de déterminer plus précisément les miARN gonadiques ou ovariens prédominants, nous avons selectionné ceux présentant un enrichissement dans l'ovaire >5 (lectures dans l'ovaire / moyenne des lectures dans les autres tissus somatiques), et avec un nombre de lectures >10.

Nous avons identifié 6 miARN annotés ovariens prédominants : ola-miR-202-5p, ola-miR-187-3p, ola-miR-202-3p, ola-miR-7552b-5p, ola-miR-187-5p, ola-miR-7552b-3p (tableau 1). Il s'agit de miARN matures retrouvés à un seul endroit dans le gènome.

L'analyse des profils d'expression issus de prost ! a montré que le miR-202-5p est exprimé dans le testis et dans l'ovaire, à tous les stades de développement folliculaire (figure 11). Il est de loin le miARN le plus exprimé dans l'ovaire avec un nombre de lectures de 207827 et avec un enrichissement ovarien >2200 (tableau 1). Il est également présent dans les premiers stades de développement embryonnaire, correspondant à l'expression des ARN maternels. En ce qui concerne miR-202-3p, bien qu'il ait un nombre de lectures 300 fois plus faible, il a un profil d'expression similaire à miR-202-5p. En ce qui concerne le miR-187-3p, il s'agit également d'un des miARN les plus exprimés dans l'ovaire du médaka, loin derrière le miR-202-5p, avec un nombre de lecture de 1396,84 et un enrichissement de 16 (tableau 1). Il est principalement exprimé dans l'ovaire, à tous les stades de développement folliculaire, avec une faible expression dans le cerveau et dans l'œuf non fécondé (figure 11).

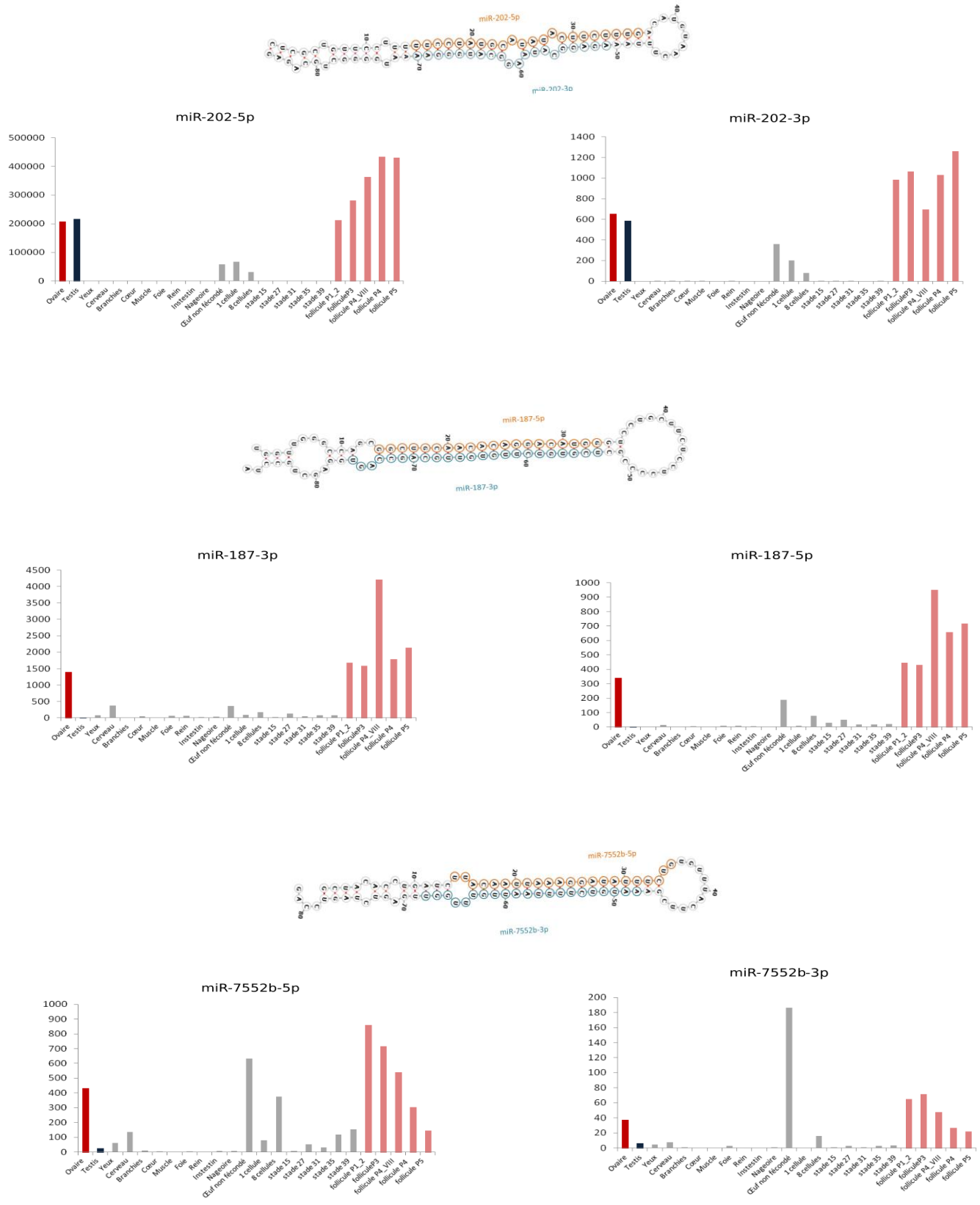


Figure 11 : Structures secondaires et profils d'expression des miARN les plus exprimés dans l'ovaire, avec une localisation unique. Structure des pré-miARN en forme de tige boucle, avec les séquences matures -3p et -5 et profils d'expressions issus de Prost des matures.

Le miR-187-5p a un nombre de lecture 4 fois plus faible mais aucune expression dans le cerveau. Enfin, le miR-7552b-5p est exprimé dans l'ovaire avec un nombre de lecture de 432 et un enrichissement de 15 (tableau 1). En plus de l'expression ovarienne et folliculaire, il est également présent au cours de l'embryogénèse et dans deux autres tissus, le cerveau et les yeux (figure 11). Le miR-7552b-3p est également présent dans l'ovaire et dans les follicules mais avec des niveaux très faibles (tableau 1).

Dans cette partie, nous avons mis en évidence 6 miARN ovariens ou gonades pédominants issus de 3 pré-miARN différents (miR-202, miR-187 et miR-7552b). Parmi ces miARN identifiés, seul le miR-202 a déjà été mis en évidence dans la littérature pour sa forte expression gonadique chez un grand nombre de vertébrés dont plusieurs poissons comme le flétan de l'Atlantique (Bizuayehu *et al.*, 2012), la truite-arc-en-ciel (Juanchich *et al.*, 2013), le médaka marin (Lau *et al.*, 2014) et le tilapia (Tao *et al.*, 2016). De plus, nos données d'expression montrent que chez le médaka adulte, le miR-202-5p semble être la forme mature prédominante, avec une expression 300 fois plus forte que le -3p. Cependant, malgrè une plus faible expression, le miR-202-3p reste présent dans les gonades avec un nombre de lecture non négligeable. Sa présence suggére qu'il pourrait également jouer un rôle dans la gamétogenèse, comme chez le poisson-zèbre, où il a été rapporté que les deux formes matures miR-202-5p et miR-202-3p sont présentes avec une expression différente. De plus, ils ont montré que miR-202-3p serait la forme mature prédominante exprimée pendant le développement des ovocytes tandis que miR-202-5p serait la forme dominante dans les ovocytes matures (Presslauer et al., 2017). MiR-202 est également beaucoup étudié pour son implication dans diverses maladies, et notamment dans de nombreux cancers où il jouerait un rôle de suppresseur de tumeur ou de régulateur d'oncogènes, en inhibant la prolifération l'invasion ainsi que la migration. En ce qui concerne les miR-187-3p et -5p, aucune étude n'a mis en évidence leur rôle dans la reproduction. En revanche, miR-187 est également impliqué dans la prolifération, la migration, l'invasion et l'apoptose cellulaires de nombreux cancer (Li *et al.*, 2018 ; Gulinaer AJ *et al.*, 2019 ; Liang *et al.*, 2020). Enfin, aucune étude n'a mis en évidence le rôle des miR-7552b-5p et -3p ni dans la reproduction, ni dans aucune maladie.

2.2 Expression des miARN gonadiques et ovariens prédominants

2.2.1 Validation de l'expression des miARNs gonadiques et ovariens

Nous avons ensuite réalisé une étape de validation des profils d'expression des miARN les plus exprimés dans l'ovaire par qPCR : miR-202-5p, miR-187-3p et miR-202-3p (figure 12).

L'analyse de l'expression par qPCR a confirmé la forte présence de miR-202-5p dans les gonades, ainsi que le profil similaire obtenu pour miR-202-3p, avec des niveaux d'expression beaucoup plus faibles (figure 12).

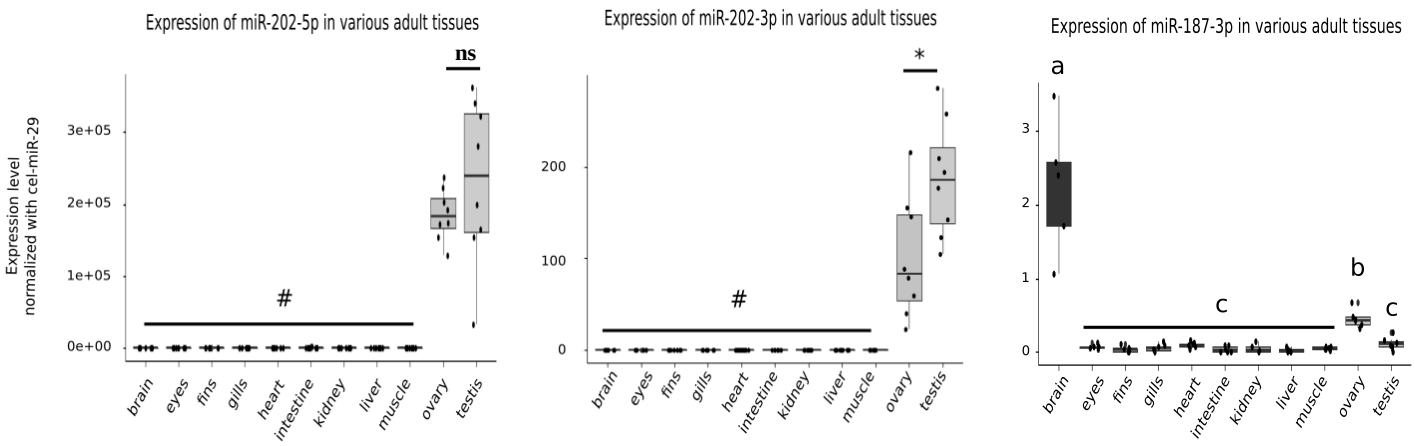


Figure 12: Profils d'expression de miR-202-5p, miR-187-3p et miR-202-3p dans les tissus du médaka.

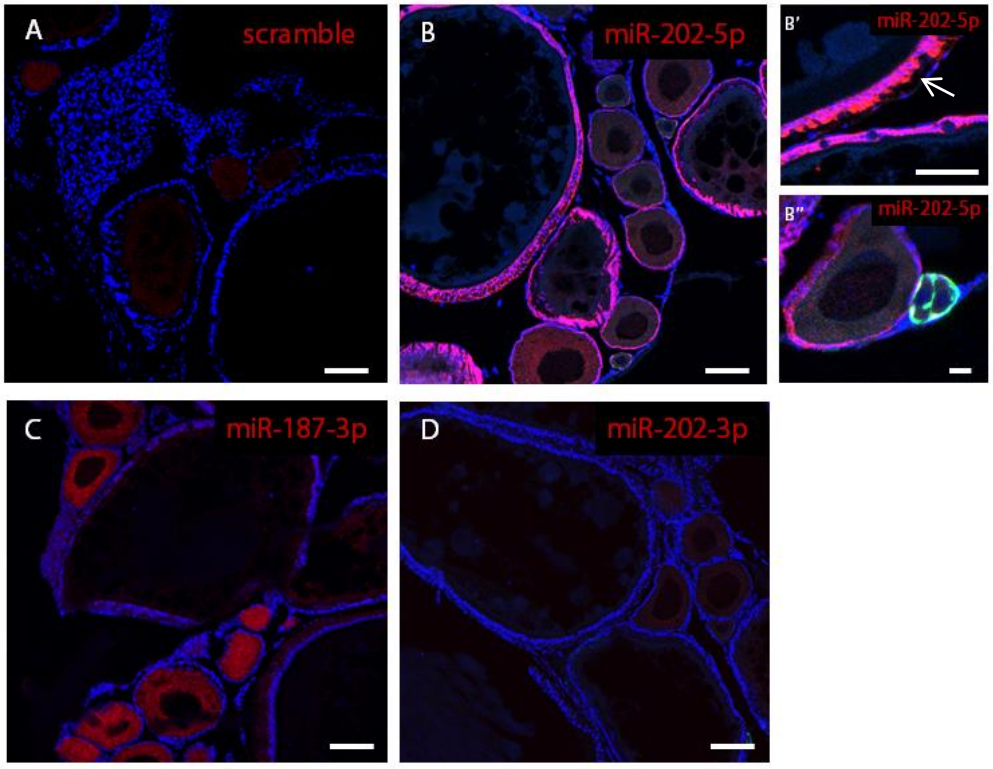


Figure 13 : Localisation de miR-202-5p, miR-187-3p et miR-202-3p dans l'ovaire adulte de médaka. Les hybridations fluorescentes *in situ* (FISH) ont été effectuées sur des sections d'ovaires de femelles medaka adultes avec des sondes de détection LNA miRNA spécifiques (en rouge) de miR-202-5p (B, B' et B''), miR-187-3p (C) et miR-202-3p (D).. V, follicule vitellogénique ; PV, follicules post-vitellogénique. Barres d'échelle : 500 µm (B), 50 µm (B', B'').

En revanche, en ce qui concerne miR-187-3p, le profil d'expression est différent de celui obtenu après séquencage, avec une expression dans l'ovaire mais non prédominate, dû à une expression plus forte dans le cerveau.

Les résultats obtenus par qPCR montrent un profil d'expression presque similaire à ceux obtenus avec le logiciel Prost !, à l'exception de l'expression de miR-187 dans le cerveau pour laquelle l'analyse a été refaite deux fois avec le même résultat. Ce résultat n'est donc pas dû à un problème lors de la qPCR mais peut-être dû soit à biais lors de la construction de la banque, soit à une différence d'expression lié à l'individu utilisé pour le séquencage (n=1) par rapport aux individus utilisés pour la qPCR.

2.2.2 Localisation des miARN gonadiques et ovariens

L'expression de ces miARN ovariens a ensuite été étudiée au niveau cellulaire par hybridation *in situ* (figure 13). Pour cette analyse, nous avons utilisé un contrôle négatif avec une sonde aléatoire (ou « scramble »), synthétisée de façon à ne reconnaitre aucune séquence dans le génome du médaka (figure 13A). Le faible marquage obtenu avec cette sonde permet d'estimer le bruit de fond de l'hybridation *in situ*.

En ce qui concerne la sonde miR-202-5p, nous avons observé un marquage spécifique dans les cellules somatiques entourant les ovocytes à tous les stades, et plus précisément dans les cellules de la granulosa des follicules de l'ovaire adulte (figure 13, B' flèche). De plus, l'hybridation *in situ* a été réalisée sur des coupes d'ovaire d'une lignée transgénique sox9b : gfp. Sox9b étant un marqueur connu des cellules somatiques très précoces de la niche germinale (figure 13, B'') (Klu¨ ver *et al.*, 2005; Nakamoto *et al.*, 2005). Ce marquage a permis de mettre en évidence une colocalisation de miR-202-5p avec sox9b permettant de suggérer que miR-202 est présent à un stade très précoce correspondant à l'apparition des premiers follicules. Concernant la sonde miR-202-3p nous n'observons aucun marquage (figure 13D). Ce résultat peut s'expliquer soit par la faible expression de miR-202-3p dans l'ovaire adulte du médaka et donc une limite de détection de cette technique, soit par une sonde LNA qui ne fonctionne pas.

En ce qui concerne miR-187-3p, nous avons observé un marquage dans les cellules germinales précoces <100 µm (figure 13C). Contrairement à miR-202, il n'y a aucun marquage de ce miARN dans les cellules somatiques entourant les cellules germinales.

Nos résultats montrent une expression précoce pour le miR-202-5p, present dans les cellules de la granulosa de la niche germinale, et pour le miR-187-3p, présent dans les ovocytes en pré-vitellogenèse. En revanche, nos résulats montrent une localisation très différente pour ces deux miARNs, avec miR-202 dans les cellules somatiques et miR-187 dans les cellules germinales, laissant supposer une fonction différente au sein de l'ovaire.

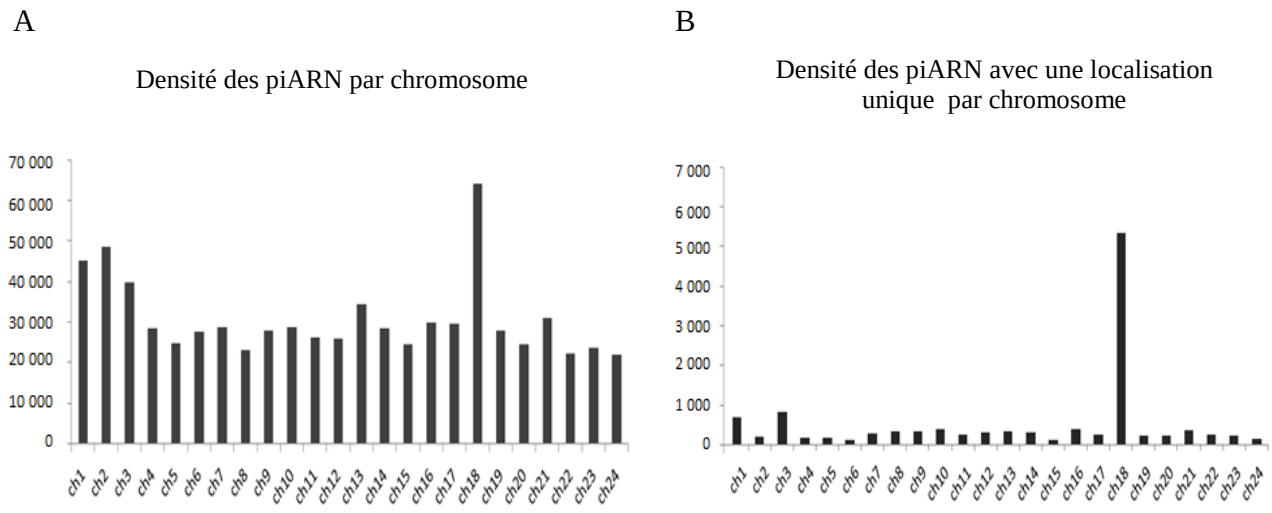


Figure 14 : Distribution des piARN dans les 24 chromosomes du médaka. A) Graphique représentant la densité des piARN allant jusqu'à 50 localisations différentes sur le génome, B) Graphique représentant la densité des piARN avec une unique localisation dans le génome.

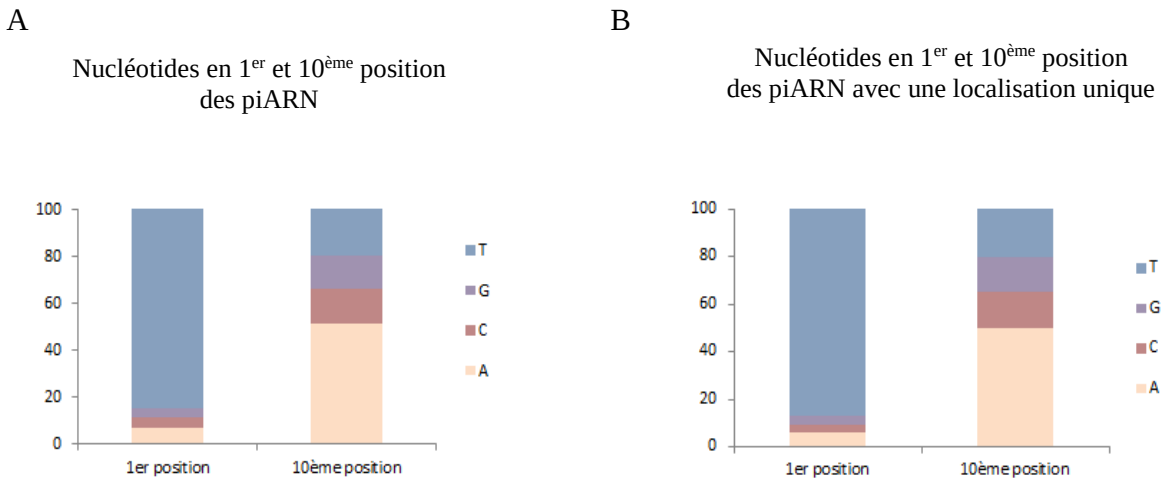


Figure 15 : Biais au niveau du 1er et 10ème nucléotide des piARN. Graphique représentant le % de A, T, G et C au niveau des 1er et 10ème nucléotides, caractéristique des deux voies de biogénèse des piARN, A) dans toutes les séquences de piARN issus de prots ! et B) pour celles retrouvées uniquement une fois dans le génome.

3. Caractérisation des piARN chez le medaka

3.1 Expression des piARN chez le médaka

Afin de pemettre l'étude plus spécifique des piARN, nous avons paramétré le logiciel Prost ! de façon à obtenir les séquences comprises entre 23 et 32 nucléotides. Les nombreuses études sur les piARN ont mis en evidence une variabilité de leurs tailles en fonction des espèces, nous nous sommes donc appuyés sur nos résultats (figure 9) pour determiner la taille des séquences à analyser. Pour cette analyse nous avons enlevé toutes les séquences retrouvées plus de 50 fois dans le génome, représentant 36,4% de la totalité des séquences obtenues.

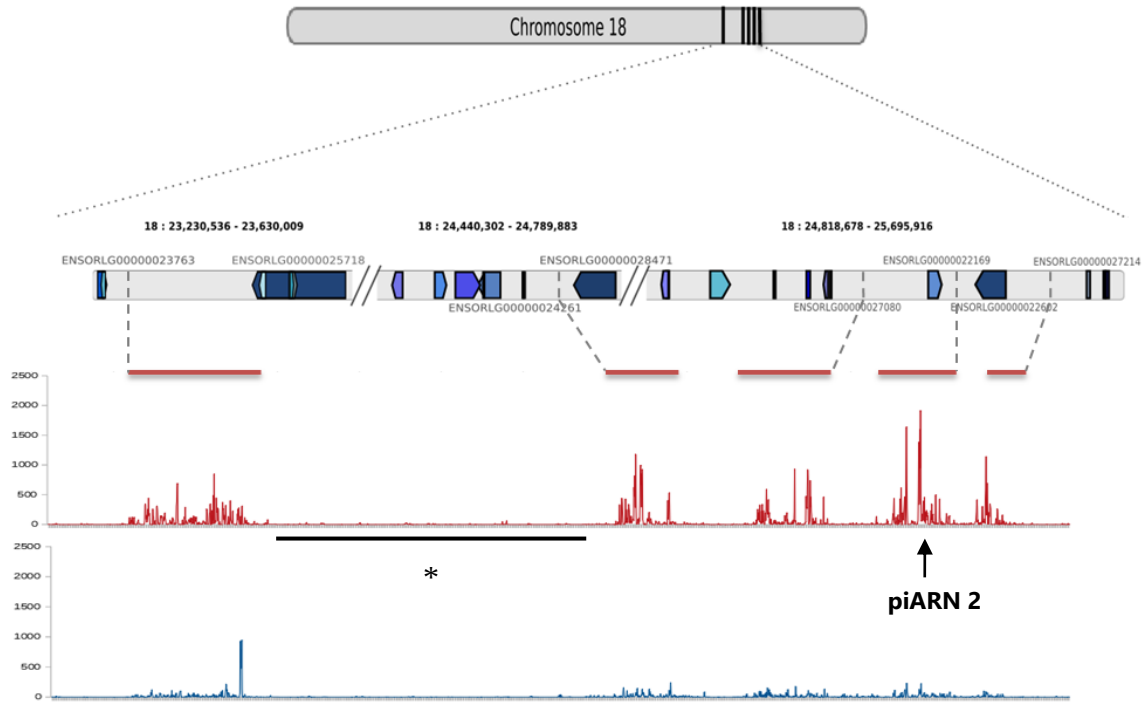
Nous avons identifié 47 122 séquences différentes avec un nombre total de 6 383 166 lectures et retrouvées à 718 485 localisations dans le génome (~15 localisations par séquence, annexe 8). Parmi ces 47 122 séquences, 12 406 ont été retrouvées une seule fois dans le génome (26,3%). La grande majorité de ces ARNnc présente une expression enrichie dans les gonades (92,3 %) par rapport aux tissus somatiques (7,7%). Nous avons également observé un fort biais au niveau du nucléotide en 1^{ere} position avec une majorité d'uridine (U : 85%) ainsi qu'en 10ème position avec une majorité d'adénine (A : 51%, figure 15A). Des résultats similaires ont été retrouvés avec les piARN à localisation unique (1er position U : 87% et 10ème position A : 50%, figure 15B).

Nos résultats montrent une abondance de piARN exprimés dans les gonades chez le médaka, avec un fort biais en uridine en 1ère position. Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés dans la littérature montrant d'une part, une expression majoritaire des piARN dans les cellules des lignées germinales similaire à celle retrouvée dans toutes les espèces étudiées à ce jour, et d'autre part la présence des deux voies de biogénèse chez le médaka (Kneitz *et al.*, 2016) se reflétant par les biais en nucléotides retrouvés de façon très marquée en position 1 et 10.

3.1.1 Distribution des piARN ovarien et gonadiques dans les chromosomes

La distribution des 47 122 séquences sur les différents chromosomes met en évidence une répartition très homogène de ces ARNnc dans le génome (environ 30 000 piARN / chromosomes), excepté pour les chromosomes 1, 2 et 3 avec environ 1,5 fois plus de piARN (40 000 - 45 000 piARN) et pour le chromosome 18 avec plus du double de piARN retrouvés (>60 000 piARN, figure 14A). En faisant la même analyse sur les piARN présentant une seule localisation dans le génome (12 406 séquences single locus), nous observons que 10% des piARN dans le chromosome 18 ont une localisation unique (~6 000 piARN) contrairement aux autres chromosomes où on ne les retrouve qu'autour de 1% (300-450 piARN, figure 14B).

A



B

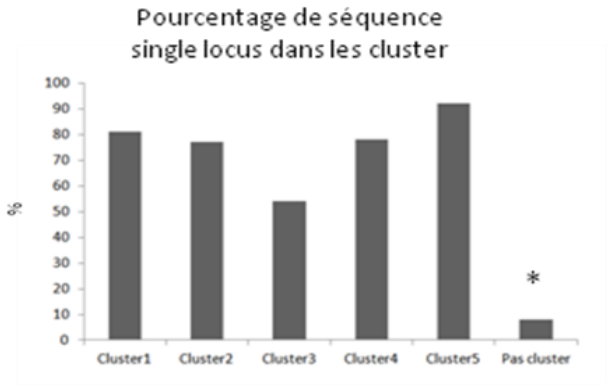


Figure 16 : Présence de 5 clusters ovariens sur le chromosome 18. A) Localisation des 5 clusters ovariens dans le génome du chromosome 18 et expression des piARN dans l'ovaire (rouge) et dans le testis (bleu). Le piARN 2 se situe dans le 4ème cluster ovarien. B) Présence des séquences à localisation unique dans les 5 clusters, et dans une région autour (*).

Id	Séquence	Localisation	Taille (nt)	Ovaire	Testis	Autres tissus (moyenne)
piARN1	TCAATGTACAGGATCTTTGGAGCTGGA	13:4720407-4720433	27	**340,64**	**59,21**	0,05
piARN2	TCAGAATTAAGGCTCTCACCCAGGTTCGGTCC	18:25435726-25435695	32	**19,03**	0,00	0,00
piARN3	AAGAGGATTCGGACTGCAAACTTCCTGTTT	13:4730386-4730415	30	**124,17**	1,18	0,04
piARN5	TGAGGATGACCTGACCCGGCGGGCTGA	13:4721822-4721848	27	**57,57**	**99,17**	0,09
piARN6	TGCTTGCACTTGCGGACTCCTGAGACGTCAC	13:4721917-4721947	31	**510,25**	**289,53**	0,19

Tableau 2 : Liste des 5 piARN issus des chromosomes 13 et 18

Lors de l'analyse de l'expression des piARN dans les ovaires et les testis de chaque chromosome, nous avons mis en évidence plusieurs groupes (ou « clusters ») avec une densité élevée de piARN ainsi qu'un fort niveau d'expression dans les ovaires et/ou dans les testis (annexe 3). Les 5 plus gros clusters ovariens ont été retrouvés sur le chromosome 18, relativement proches les uns des autres (entre la position 23 230 000 et 25 700 000, annexe 3 et figure 16A). Ils sont situés dans des régions non codantes du chromosome 18. Le biais concernant les nucléotides en 1ère position (U : 88,4% en moyenne) et en 10ème position (A : 49,8% en moyenne) est le même dans ces clusters que dans les autres régions (annexe 4). En revanche, nous avons observé une majorité de séquences avec une localisation unique dans le génome dans ces 5 clusters (54 à 92% selon les clusters, figure 16B) par rapport aux autres régions (figure 16B, étoile). D'autres gros clusters avec des expressions gonadiques ou testiculaires ont également été retrouvés respectivement dans les chromosomes 13 et 19 (annexes 3 et 5).

Nos résultats montrent une répartition assez homogène des piARN dans le génome du médaka, excepté pour le chromosome 18 qui semble regrouper un plus grand nombre de piARN que les autres. Nos données mettent également en évidence 5 gros clusters ovariens, composés majoritairement de séquence à localisation unique sur le génome, tous situés dans la même région du chromosome 18.

3.1.2 Validation de l'expression des piARN

Une partie des études portant sur l'analyse des piARN sont réalisées avec une étape d'oxydation ou d'immunoprécipitation avec les protéines PIWI avant le séquencage. Ainsi les chercheurs sont certains de travailler avec des ARNnc de la classe des piARN. Dans notre cas nous ne pouvions pas réaliser ces étapes en amont du séquencage car nous voulions également selectionner les miARN. Nous nous sommes donc appuyés sur les différentes caractéristiques connues des piARN pour analyser nos données.

Une 1ère analyse de nos séquences a permis de montrer la présence de deux caractéristiques connues et spécifique de la classe des piARN, le biais de nucléotide U en 1er et A en 10ème position ainsi que leur présence sous forme de clusters dans le génome. Cependant, ces données restent insuffisantes pour confirmer la classe de nos ARNnc. Ainsi, nous avons utilisé une autre caractéristique connue des piARN, qui est la présence d'un groupement 2'-O-méthyl à leur extrémité 3' ajouté lors de leur maturation (Horwich *et al.*, 2007). Nous avons réalisé une étape d'oxydation afin de dégrader les ARN non protégés à leurs extrémités, c'est-à-dire sans groupement 2'-O-méthyl (Kneitz *et al.*, 2016). Nous avons ensuite analysé l'expression des piARN prédits avant et après oxydation par qPCR.

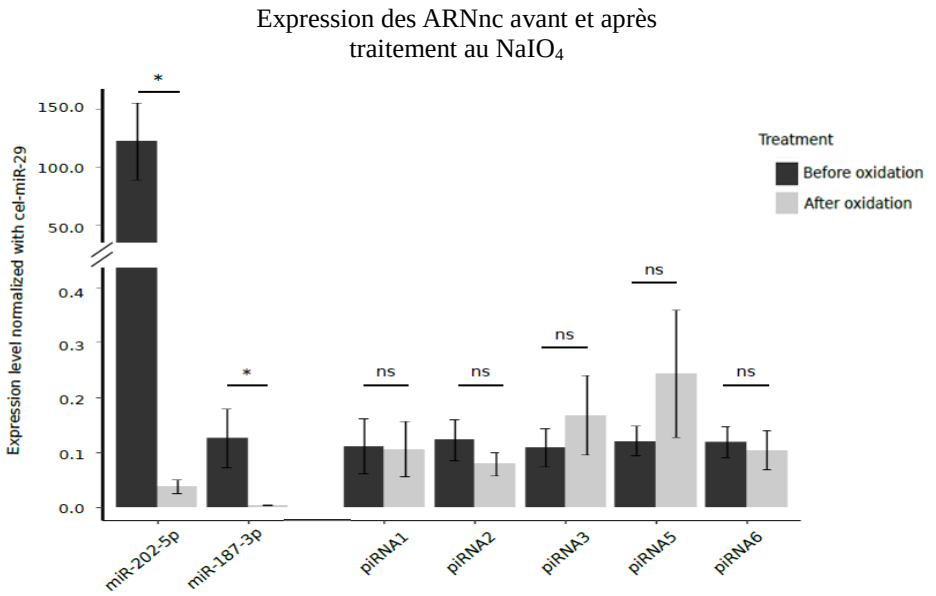


Figure 17 : Profils d'expression de miARN et piARN avant et après une étape d'oxydation. Deux miARN et cinq piARN ont été analysés par qPCR taqman avant et après oxydation.

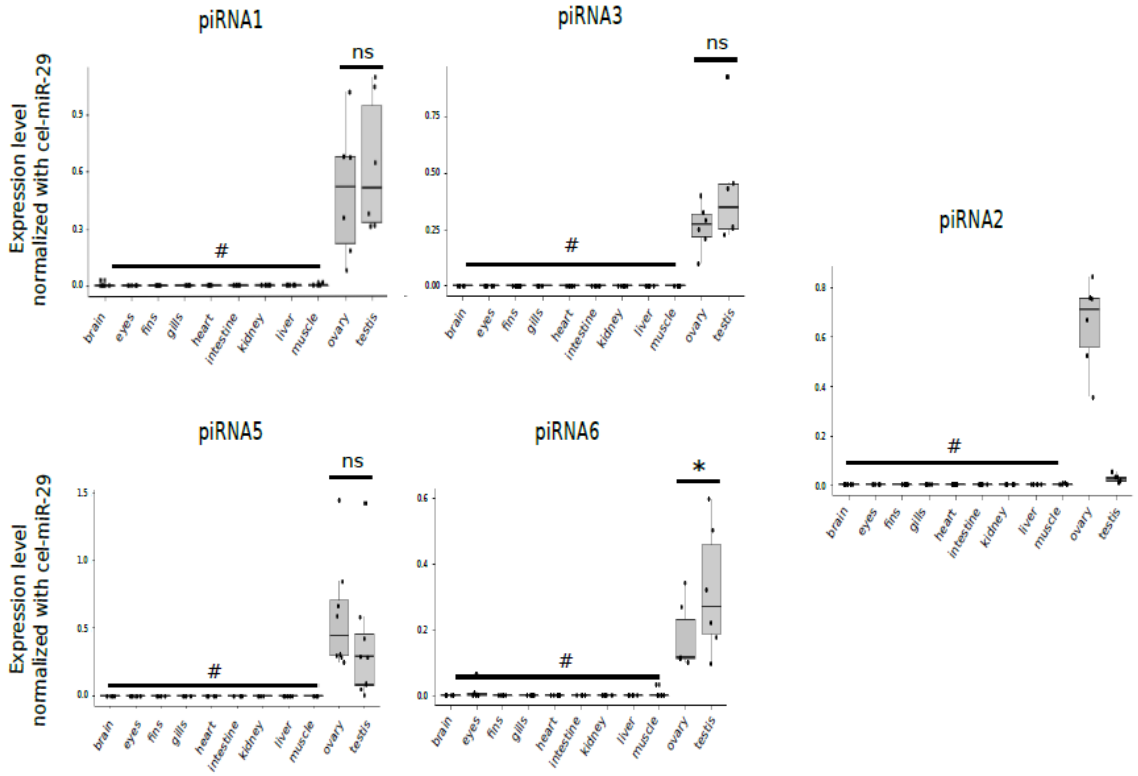


Figure 18 : Profils d'expression de 5 piARN dans les tissus adultes du médaka. Les piARN ont été analysés par qPCR taqman dans 11 différents tissus. Le cel-miR-39-3p a été utilisé comme calibrateur externe pour la normalisation. Test statistique Wilcoxon, ns : pas de différence significative, * : différence significative ($p<0,05$)

Pour cela, nous avons choisi 5 ARNnc, avec une localisation unique dans le génome : les piARN 1, 3, 5 et 6 localisés sur le cluster gonadique du chromosome 13 (tableau 2, annexe 4), et le piARN 2 sur un des clusters ovariens du chromosome 18 (tableau 2, figure 16A). Les miR-202-5p et miR-187-3p ont été utilisés pour valider l'efficacité du traitement au periodate de sodium (NaIO4).

L'analyse d'expression par qPCR met en evidence une absence des miARN après traitement au NaIO4, confirmant ainsi la dégradation des ARN non protégés par un groupement méthyl lors de l'étape d'oxydation (figure 17). En revanche, il n'y a aucune dégradation des 5 ARNnc après l'étape d'oxydation, renforcant ainsi la probabilité que nos séquences soient bien des piARN.

Enfin, nous avons vérifié l'expression de ces 5 piARN dans les tissus afin de valider les données obtenues suite au séquencage et à l'analyse de données. Les résultats obtenus par qPCR confirment le profil clairement gonadique pour les piARN1, piARN3, piARN5 et piARN6 et un profil d'expression spécifique à l'ovaire en ce qui concerne le piARN2 (figure 18).

Ces résultats mettent en évidence un profil d'expression correspondant exactement aux profils issus de prost permettant de valider notre jeu de données. De plus, nous avons montré que 5 ARNnc pris aléatoirement dans la liste sur 5 ont resisté à l'oxydation nous confortant sur notre analyse de donnée et le fait que nous travaillons bien avec des ARNnc de la classe des piARN.

3.2 Les piARN régulateurs de gène

Nous avons ensuite cherché à identifier les piARN impliqués dans la régulation génique, et non ceux protecteur du génome ciblant les TE. Pour cela, nous nous sommes basés sur l'étude de Larriba et Del Mazo montrant une population de piARN impliqués dans la régulation de la spermatogénèse chez la souris (Larriba et Del Mazo, 2018). Dans ce travail, Larriba et Del Mazo ont selectionné les piARN régulateur de gène en réalisant un alignement des piARN avec les TE et les séquences répétées afin d'identifier ceux non liés aux TE, puis ils ont réalisé une analyse *in silico* de ces piARN. Ils ont ainsi pu mettre en évidence des caractéristiques différentes entre ces piARN et ceux liés aux TE.

Dans cette partie nous avons utilisé le même processus *in silico* pour obtenir les piARN non alignés avec les TE et nous avons utilisé également la même nomenclature que celle de leur étude, ainsi nous nommerons les séquences non alignées aux TE, et pouvant être impliqués dans la régulation génique, les « NRApiRNA » (Non-Repeat associated piRNA) et celles liés aux TE les « RApiRNA » (Repeat associated piRNA).

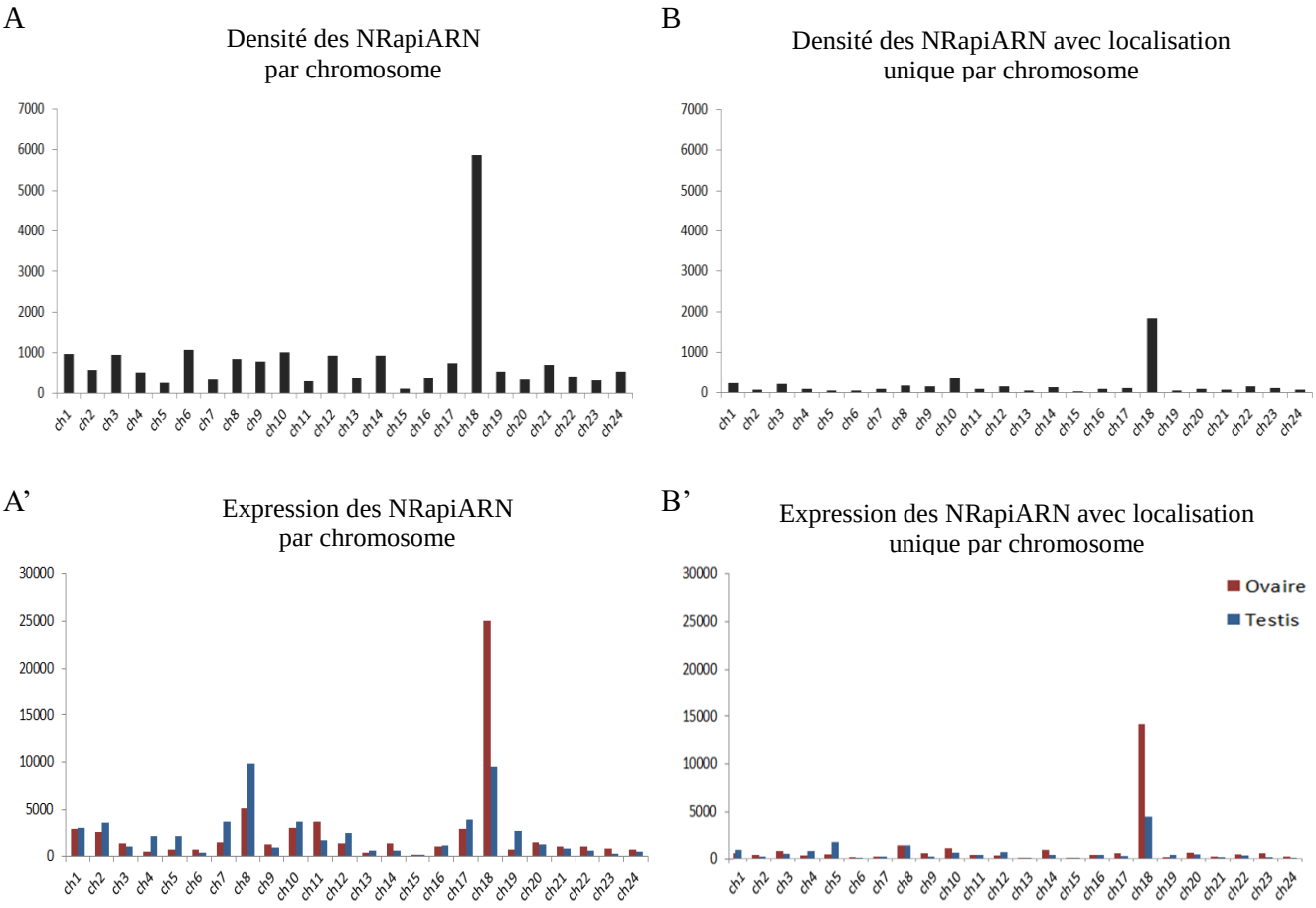


Figure 19 : Distribution et expression des NRapiARN dans les chromosomes. A et A') Graphique représentant la densité et l'expression des piARN allant jusqu'à 50 localisations différentes sur le génome, B et B') et la densité et l'expression des piARN avec une unique localisation dans le génome.

Nous avons identifié 8 324 séquences (17,7%) non alignées avec les TE et les séquences répétées, pouvant correspondre à des NRapiRNA et 38 788 séquences (82,3%) correspondant à des RapiARN (annexes 6 et 8). Les 8 324 NRapiARN ont été retrouvés à 19 899 différentes localisations sur le génome (~2,4 localisations par séquence), contrairement aux 38 788 RapiARN qui ont été retrouvés à 698 586 endroits (~18 localisations par séquence). Ce résultat montre que les NRapiARN ont un nombre de copie très faible dans le génome. Nous avons pu confirmer ce résultat en analysant les NRapiARN et RapiARN retrouvés qu'une seule fois dans le génome. En effet, 54% des NRapiARN ont une localisation unique contre 20,4% pour les RapiARN (annexe 6). En revanche, l'analyse des séquences n'a mis en evidence aucune différence de taille entre les RapiARN (27,7 nt) et les NRapiARN (28 nt) (annexe 7), ni aucune différence en ce qui concerne le biais majoritaire de U en 1er position et le A en 10ème (annexe 7).

L'analyse de la distribution des 8 324 NRapiARN par chromosome montre une répartition très homogène de ces ARN sur le génome (~500 piARN / chromosome), excepté pour le chromosome 18 où on en retrouve 10 fois plus (~6 000, figure 19A). En analysant les 4 496 NRapiARN avec une seule localisation dans le génome, on s'apercoit que 41% de ces piARN se situent sur le chromosome 18 (1 852 séquences, figure 19B). L'analyse de l'expression des NRapiARN dans l'ovaire et le testis montre un fort profil ovarien pour le chromosome 18 (~24 000 lectures, figure 19A'), dont 58% de l'expression est retrouvé chez les NRapiARN avec une seule localisation dans le génome (figure 19B).

A partir des 4496 NRapiARN retrouvés avec une seule localisation dans le génome nous avons réalisé une analyse différentielle suivie d'un calcul de score d'enrichissement dans l'ovaire. Nous avons pu ainsi identifier 1121 NRapiARN ovariens avec une localisation unique. La majorité d'entre eux ont un nombre de lecture très faible (51% ont une expression <10 lectures). De façon interessante, les 4 piARN les plus exprimés de cette liste (avec des expressions dans l'ovaire de 2035, 768, 542 et 395) se situent dans les clusters ovariens du chromosome 18 (annexe 9).

Nos résultats ont mis en évidence un nombre important de NRapiARN (17,7%), beaucoup plus élevé que les données retrouvées dans l'étude de Larriba et Del Mazo, où les auteurs ont mis en évidence 2% de NRapiARN dans les ovocytes. Les auteurs ont également mis en évidence une différence de taille, ainsi qu'une différence en ce qui concerne le 1er nucléotide entre les NRapiARN et les RapiARN, des différences que nous n'avons pas retrouvées avec les NRapiARN et RapiARN chez le médaka. Ces données suggérent qu'il n'y a pas la même population de NRapiARN chez le médaka que celle retrouvée lors de la spermatogenèse chez la souris. En revanche, nos données sur les NRapiARN, ainsi que celles sur les clusters de piARN, mettent en évidence un grand nombre de piARN ovariens, non liés aux TE et avec une localisation unique et présents sur le chromosome 18.

4. Discussion

4.1 Divergence avec les données de la littérature

Depuis l'avénement des technologies de séquencage à haut débit, de nombreuses études ont cherché à caractériser les miARN chez les vertébrés, dont les téléostéens. Ainsi, en 2010, Li *et al.* ont caractérisé les miARN présents chez le médaka par une approche de séquencage (Li *et al.*, 2010). Plus récemment, deux études ont identifié les miARN exprimés de façon spécifiques ou prédominantes dans les gonades (Bouchareb *et al.*, 2017 ; Qiu *et al.*, 2018).

Une première étude, réalisée au sein du laboratoire, a permi de mettre en évidence les miARNs ovariens par une approche d'analyse transcriptomique de puce microarray de miARN (Bouchareb *et al.*, 2017). Lors de ce travail, Bouchared *et al*. ont utilisé 3 800 sondes distinctes provenant de différentes espèces de vertébrés et ont identifié 20 miARN présentant une expression ovarienne prédominante. Parmi ces miARN, seul le miR-202-3p a été retrouvé en commun avec notre liste de miARN ovariens. La différence dans ces résultats peut s'expliquer par les différentes approches utilisées (puce microarray vs NGS). En effet, les puces offrent une alternative rapide et peu coûteuse comparée au séquençage mais ont également des inconvénients, dont notament la longueur des sondes utilisées qui varient entre 11 et 20 nucléotides. Cette longueur limite considérablement la spécificité des sondes ainsi que leur identification. De plus, les puces que nous avons utilisées n'étaient pas spécifiques du médaka mais étaient composée de sondes spécifiques de nombreuses espèces de poissons ou de vertébrés. En effet, seules les séquences disponibles dans miRbase peuvent être disposées sur la puce par le fabriquant et comme indiqué plus haut, seule la séquence « seed » est très conservée entre espèces. L'utilisation de sondes majoritairement hétérologues a été susceptible de créer un bruit de fond et/ou un taux de faux positifs important(s).

Plus récemment, une autre étude a mis en évidence des miARN gonadiques du médaka par une approche de séquencage similaire à la nôtre (Qiu *et al.*, 2018). Dans ce travail, les auteurs se sont interessés aux miARN avec une expression différentielle entre l'ovaire et le testis. Ils ont identifié 673 miARN matures (285 miARN conservés et 388 nouveaux miARN) en selectionnant les séquences entre 18 et 26 nt. Parmi ces miARN, seul le miR-202-5p a été retrouvé dans notre liste et avec des données d'analyses différentes des nôtres. En effet, ils montrent une expression abondante de miR-202-5p dans le testis, alors que nous ne voyons pas de différence significative entre le testis et l'ovaire. Ils ont également étudié la localisation cellulaire du miR-202-5p par FISH et montré qu'il est présent tout au long de la spermatogenèse, et dans les ovocytes aux premiers stades de l'ovogenèse. Ce résultat ne correspond pas à celui que nous avons observé par FISH. En effet, nous retrouvons miR-202-5p localisé dans les cellules de la granulosa à tous les stades de développement folliculaire. Nous avons répété cette expérimentation en utilisant du tissu congelé et

non fixé, ce qui aurait pu expliquer les différences observées, et nous avons obtenu le même résultat, c'est-à-dire un marquage de miR-202-5p dans les cellules de la granulosa (figure 13). Une explication de cette différence d'expression pourrait venir de la sonde LNA de chez Exiqon qu'ils ont utilisé pour la FISH. En effet, leur sonde miR-202-5p a un nucléotide différent par rapport à la notre (5'-AAAGA**G**GTATATGCATAGGAA-3' au lieu de 5'-AAAGA**A**GTATATGCATAGGAA-3') et correspond à la séquence miR-202-5p du poisson-zèbre et non celle du médaka. Etant donné la très forte spécificité des sondes LNA, il s'agit de l'hypothèse la plus probable pour expliquer la différence de marquage.

En ce qui concerne les piARN, une seule étude a décrit ces ARNnc dans les gonades chez les médaka (Kneitz *et al.*, 2016). Cette étude était principalement axée sur l'identification des piARN différentiellements exprimés dans les testicules de médaka sauvage par rapport à des médaka transgéniques développant divers types de mélanomes. Les résultats obtenus par Kneitz *et al*. lors de cette étude sont très différents des nôtres, avec un nombre de piARN identifiés beaucoup plus faibles. Cette différence peut s'expliquer d'une part par le fait qu'ils ont réalisé l'étape d'oxydation avant le séquencage, et d'autre part parceque nous n'avons pas utilisé les mêmes paramètres qu'eux pour l'analyse des données (taille, localisation multiple, etc …). En effet, ils ont selectionné les séquences entre 25 et 32 nt pour être sûrs de ne pas avoir de miARN dans leur jeu de données, or nous avons fait le choix de prendre les séquences à partir de 23 nt en ajoutant une étape lors de l'analyse *in silico* pour enlever les miARN dont le répertoire est désormais bien connu chez le médaka. Malgrè ce nombre de piARN qui différe, d'autres données sont cohérentes avec celle obtenues dans le papier comme le % de U en 1er position et de A en 10ème.

4.2 Présence de piARN régulateurs chez le médaka ?

A l'heure actuelle, il est admis qu'une grande partie des piARN dérivent de séquences de TE et induisent la mise sous silence (ou « silencing ») de ces TE au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (Ishizu *et al.*, 2012). Cependant, d'autres études plus récentes ont montré que des piARN pouvaient être générés à partir de groupes génomiques sans lien avec les TE et avoir des fonctions supplémentaires indépendantes de la mise sous silence des TE, comme des rôles potentiels dans la régulation de l'expression des gènes. Un des exemples montrant ce type de régulation lors de la gamétogenèse est la présence d'une population de piARN régulant les ARNm lors de la spermatogénèse chez la souris. Une étude récente sur l'analyse *in silico* de cette population de piARN impliqué dans la spermatogenèse a permis de mettre en évidence des propriétés différentes entre les piARN liés aux TE, les « RApiARN » et ceux independant des TE, les « NRapiARN » (Larriba et del Mazo, 2018). Dans ce travail, nous avons identifié 8 324 NRapiARN dans les ovaires du médaka, en utilisant le même pipeline bio-informatique que celui utilisé par Larriba et Del Mazo. Cependant, aucune des caractéristiques mis en évidence dans cette

étude pour reconnaitre les NRapiARN (quantité des NRapiARN, taille, 1er nucléotide du piARN) n'a été retrouvé lors de notre analyse chez le médaka. La population de NRapiARN mis en évidence lors de la spermatogenèse chez la souris, avec les caractéristiques décrites dans cette étude, n'a jamais été observée dans d'autres espèces. Il est donc fort probable cette population de piARN ne soit pas présente chez le médaka et que nous soyons en présence de différences liées à l'espèce et/ou à l'organe étudié. Cependant, ces résultats ne remettent pas en cause la présence de piARN avec un rôle de régulateur génique chez le médaka.

D'autres études ont montré l'implication plus ponctuelle de piARN dans la régulation génique telle que celle impliquant les piARN dans la régulation des ARNm dans la lignée germinale de C. *elegans*. Dans ce cas, il s'agit de petits piARN de 21nt qui sont chargés dans la protéine PIWI PRG-1 et ciblent les ARNm de la lignée germinale par appariement incomplet des bases (Bagijn *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2012). Le ciblage des ARNm par les piRNAs/PRG-1 induit la production de petits ARN antisens secondaires (appelés ARN 22G) par des ARN polymérases ARN-dépendantes. A leur tour, les ARN 22G sont chargés dans les protéines Argonaute du groupe WAGO, qui induisent une répression de la cible ARNm transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (Seth *et al.*, 2013 ; Wedeles *et al.*, 2013). Un autre exemple de contrôle de la régulation des gènes par les piARN implique l'ARNm *ddx4*, qui code pour la protéine Ddxa (anciennement Vasa), un déterminant majeur de la lignée germinale. Dans les testicules de la drosophile, l'ARNm *ddx4* est régulé par les piARN qui sont produits à partir de séquences répétées non liés aux TE sur le chromosome X, appelés « AT-chX » (Nishida *et al.*, 2007 ; Nagao *et al.*, 2010).

L'analyse transcriptomique réalisée lors de ce travail nous a permis de mettre en évidence des ARNnc ovariens particulièrement interessant pour leur potentiel rôle dans l'ovogenèse. Ces résultats ouvrent des pistes que nous souhaitons explorer à l'avenir en réalisant notamment des analyses fonctionnelles pour les plus prometteurs d'entre eux.

PARTIE II : ETUDE DU ROLE DE MIR-202 DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'OVAIRE CHEZ LE MEDAKA

Dans la première partie de ce travail, nous avons identifié 3 miARN (miR-202, miR-187 et miR-7552b) avec une expression prédominante dans l'ovaire chez le médaka. Parmi ces miARN, le miR-202 semble être un candidat idéal pour une analyse plus approfondie. En effet, sa forte expression prédominante dans les gonades, ainsi que sa localisation dans l'ovaire, laissent fortement suggèrer que miR-202 pourrait être associé à un rôle majeur dans la reproduction. Il a déjà été mis en évidence dans les gonades de nombreuses espèces, malheureusement, la majorité des données sur miR-202 repose sur des analyses d'expression et ne permet pas de comprendre sa fonction. L'objectif de cette partie a donc été de réaliser une étude fonctionnelle de miR-202 afin de determiner sa fonction dans l'ovogenèse chez le médaka.

1. Etat de l'art : miR-202

MiR-202 a tout d'abord été mis en évidence chez les xénopes en 2008, où P. Michalak et J. Malone ont observé la présence de la forme mature miR-202-5p dans les testicules (Michalak *et al.*, 2008). Puis l'expression de miR-202-5p a été observée plus spécifiquement dans les cellules germinales de l'ovaire chez *Xenopus tropicalis* (Armisen *et al.*, 2009). Chez la souris, miR-202-5p a été mis en évidence dans les cellules somatiques au cours de la différenciation des testicules, et non dans les cellules germinales (Wainwright *et al.*, 2013). De plus, il a été montré que le knock-out (KO) de *Sox9b*, facteur de transcription suggéré en amont du pri-miR-202, réduirait l'activité des cellules souches spermatogonales, indiquant que miR-202 serait un régulateur clé de la spermatogenèse. Chez le poulet, S. Bannister *et al.* ont montré une expression sexuellement dimorphique du miR-202 pendant la différenciation sexuelle des gonades et ont suggèré une implication de miR-202-5p dans la régulation du développement testiculaire (Bannister *et al.*, 2009 ; Bannister *et al.*, 2011). Ces données ont été renforcées en 2017 par Lu Xu *et al.* qui ont montré l'implication de miR-202-5p dans le développement des cellules germinales lors de la spermatogenèse (Xu *et al.*, 2017). En 2015, chez l'homme, il a été montré que miR-202-5p s'exprimerait dans les cellules somatiques (cellule de sertoli) et qu'il pourrait jouer un rôle dans l'interaction entre ces cellules somatiques et les cellules germinales pendant la spermatogenèse (Landgraf *et al.*, 2007 ; Dabaja *et al.*, 2015).

Chez les poissons, la fonction miR-202 en reproduction est beaucoup moins documentée. Quelques études ont rapporté l'expression de miR-202 dans les gonades chez divers poissons comme le Flétan de l'Atlantique (Bizuayehu *et al.*, 2012), la truite-arc-en-ciel (Juanchich et al., 2013), le médaka marin (Lau *et al.*, 2014) et le tilapia (Tao *et al.*, 2016). Les études réalisées chez le poisson-zèbre ont montré d'une part, l'expression de miR-202-5p principalement dans les

Fréquence de ponte

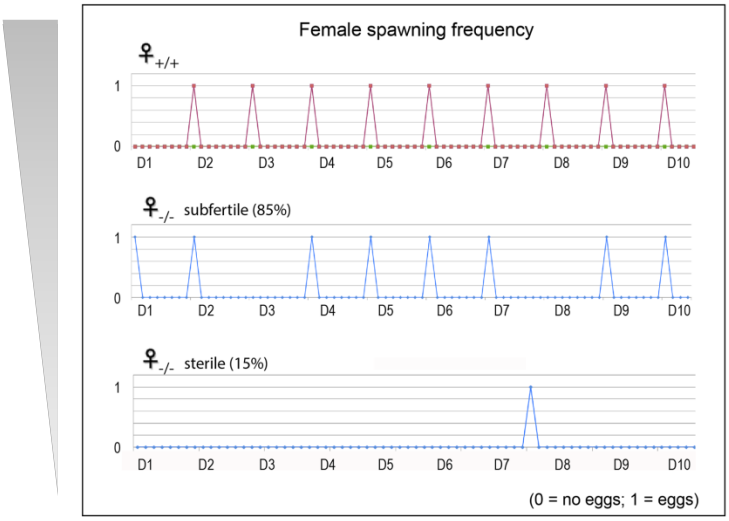


Figure 20 : Analyse de la fréquence de ponte des femelles adultes mir-202 -/-.

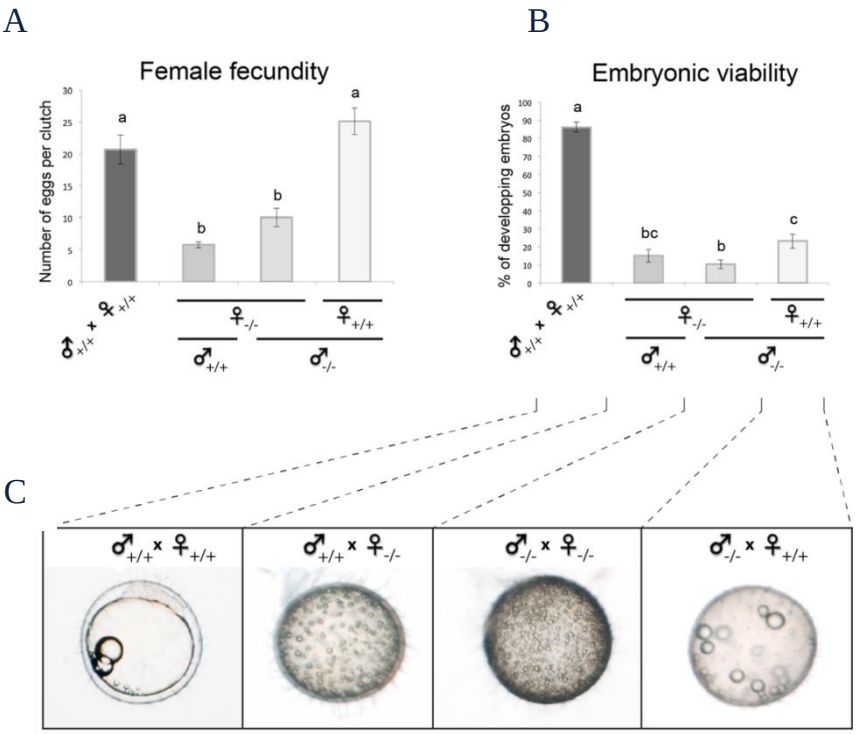


Figure 21 : Analyse du phénotype de reproduction des poissons adultes mir-202 -/-. (A) Nombre d'œufs pondus par des femelles de type sauvages ou mutants « sous-fertiles ». (B) Viabilité embryonnaire des œufs. (C) Images représentatives d'œufs provenant des différents croisements de mâles et de femelles de type sauvages et mutants. Les valeurs moyennes (± SEM) sont affichées sur les graphiques. Différentes lettres indiquent une différence significative, telle que déterminée par un test ANOVA à sens unique (test post hoc de Tukey).

cellules germinales au cours de la spermatogenèse (Jia *et al.*, 2015), et d'autre part l'expression de miR-202-5p dans les ovaires (Zhang *et al.*, 2017). Il a été rapporté de façon plus précise que miR-202-3p est la forme mature prédominante exprimée pendant le développement des ovocytes tandis que miR-202-5p est la forme dominante dans les ovocytes matures. (Presslauer *et al.*, 2017). En 2018, Weiwei Qiu *et al.* ont mis en évidence la présence de miR-202-5p tout au long de la spermatogenèse chez le médaka et suggèrent que ce miARN pourrait être un candidat crucial pour la différenciation et le développement des mâles (Qiu *et al.*, 2018). Enfin, ils suggèrent que miR-202 serait présent dans les ovocytes précoces et non dans les cellules somatiques.

2. Succès de reproduction considérablement réduit en l'absence de mir-202

Une lignée mutante miR-202-/- a été créée dans l'équipe dans le cadre d'un projet de thèse d'Amine Bouchareb portant sur les miARNs ovariens chez le médaka. A partir de cette lignée (INDEL -7+3), le phénotype de reproduction a été étudié de façon approfondie en analysant la fréquence de ponte, la quantité et de la qualité des œufs pondus.

2.1 Fréquence de ponte

L'analyse de la fréquence de ponte a mis en évidence deux catégories de femelles mutantes avec des phénotypes reproducteurs différents (figure 20) :

- Les femelles légèrement affectées ou « sous- fertiles » qui présentent une fréquence de ponte irrégulière par rapport aux femelles sauvages qui pondent chaque jour. Ces femelles représentent 85 % des femelles mutantes analysées.
- Les femelles fortement affectées ou « stériles » qui ne pas pondent pas ou qu'une fois en dix jours. Ces femelles représentent 15 % des femelles mutantes analysées.

2.2 Quantité d'œufs pondus

Une analyse plus poussée de la fécondité (la quantité d'œufs pondus) a été réalisée sur les femelles « sous-fertiles ». Cette analyse a révélé que les femelles mutantes produisent un nombre significativement d'œufs réduit (5,8 œufs par ponte en moyenne) par rapport aux femelles sauvages (20,8 œufs par ponte en moyenne, figure 21A). Les résultats sont similaires lorsque les femelles « sous-fertiles » sont accouplées avec des mâles mutants. Par contre, il n'y a aucune réduction d'œuf lorsque les femelles sauvages sont croisées avec des mâles mutants.

2.3 Qualité des œufs pondus

En ce qui concerne la viabilité des embryons (la capacité des œufs à être fécondés et à se développer correctement), elle est considérablement réduite dès le moment où un des géniteurs est porteur de la mutation, qu'il soit mâle ou femelle (figure 21B). L'observation macroscopique des œufs issus de ses différents croisements a révélé que ceux provenant des femelles « sous-fertiles »

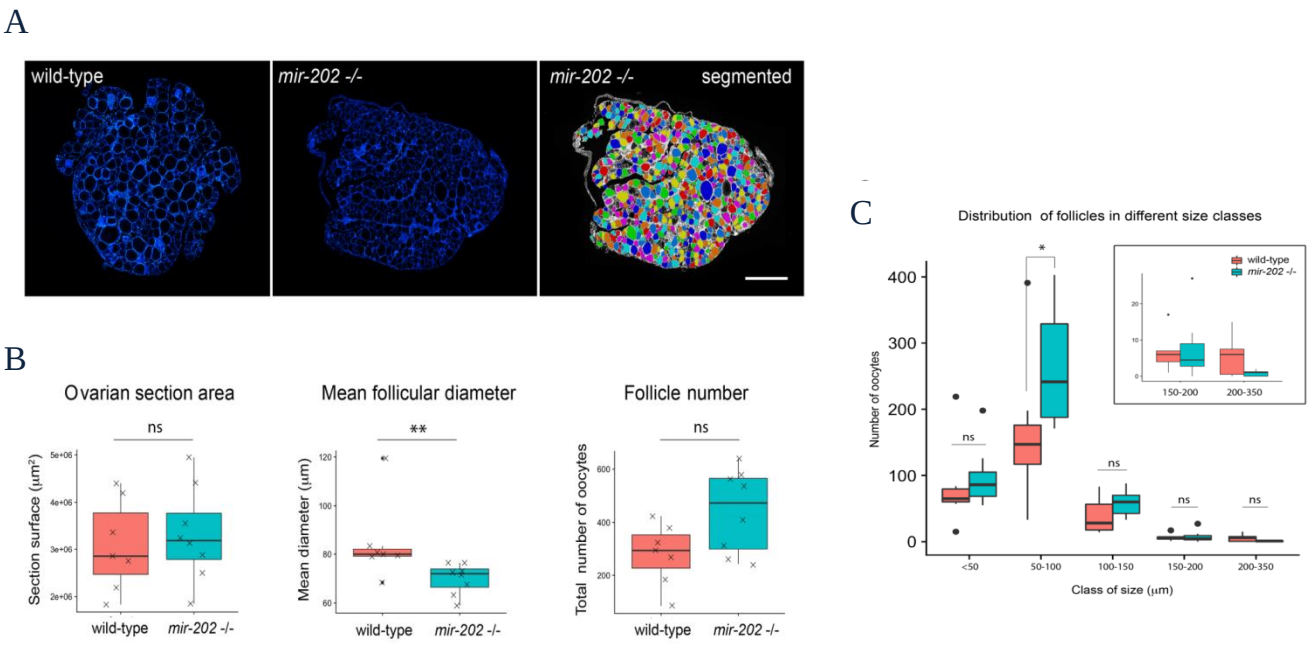


Figure 22 : Analyse quantitative d'images d'ovaires de femelles mir-202 -/- juvéniles. (A) Sections médianes des ovaires de poissons juvéniles de type sauvage (n=7) et mir-202 -/- (n=8). (B) Superficie de la section, diamètre moyen du follicule et nombre de follicules. (C) Répartition des follicules en fonction de leur taille. Barre d'échelle : 500 µm.

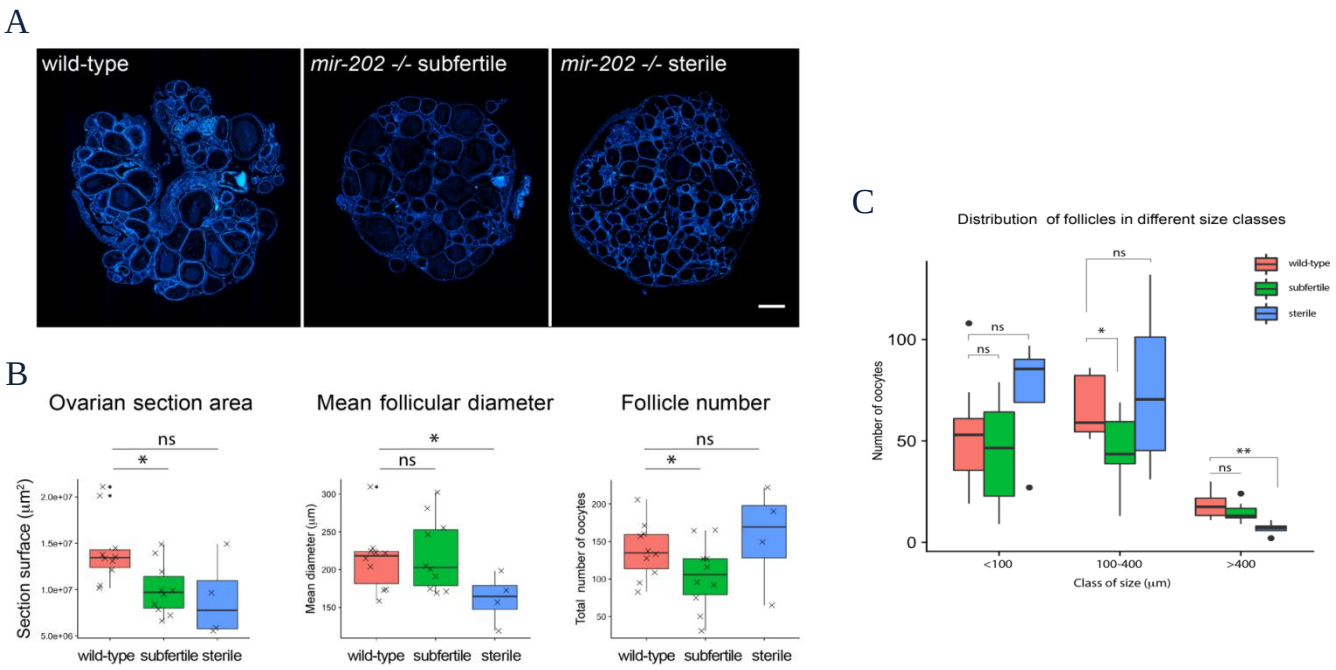


Figure 23 : Analyse quantitative d'images d'ovaires de femelles adultes « stériles » et « sous-fertiles » mir-202 -/-. (A) Sections médianes des ovaires de femelles mutantes de type sauvage (n=10), stériles (n=5) et subfertiles (n=10). (B) Superficie de la section, diamètre moyen du follicule et nombre de follicules. (C) Répartition des follicules en fonction de leur taille. Barre d'échelle : 500 µm.

accouplées à des mâles sauvages ou mutants ne pouvaient pas être fécondés, tandis que ceux provenant de femelles sauvages accouplées à des mâles mutants étaient fécondés mais avec un arrêt de développement dès les premiers stades de clivage du développement embryonnaire (figure 21C).

Nos résultats mettent en évidence un phénotype de reproduction très sévèrement touché en l'absence de miR-202, allant jusqu'à rendre 15% des femelles stériles. De plus, ces données montrent que miR-202 est essentiel à la formation de gamètes fonctionnelles dans les gonades féminines mais également masculines.

3. Blocage de la croissance folliculaire en l'absence de mir-202

Afin d'aller plus loin dans l'étude du rôle de miR-202 dans l'ovogenèse, le contenu folliculaire des ovaires de femelles sauvages et mutantes a été comparé chez des femelles juvéniles (figure 22) et chez des femelles adultes « sous-fertiles » et « stériles » (figure 23). Pour cela, la surface des sections, le diamètre moyen des follicules, le nombre de follicules ainsi que la distribution de la taille des follicules ont été analysés.

3.1 Chez les juvéniles

Le diamètre folliculaire moyen est significativement réduit (70 µm) sur les coupes d'ovaire mir-202 -/- par rapport aux sauvages (80 µm, figure 22B). En ce qui concerne le nombre de follicule, il semble plus élevé chez les mutants (500) que chez les sauvages (300), bien que non significatif. L'analyse de la distribution du nombre de follicule par rapport à leur taille a révélé des profils différents chez les mutants par rapport aux sauvages (figure 22C). Chez les mutants, le nombre de petits follicules semblent plus élevé que chez les sauvages, avec une augmentation significative dans la classe de taille 50-100 µm. A contrario, le nombre de follicules de diamètre plus important (200-350 µm) ont tendance à diminuer chez les mutants par rapport aux sauvages, résultats non significatifs.

3.2 Chez les adultes « stériles »

Chez les femelles adultes mir-202 -/- « stériles », le diamètre folliculaire moyen est significativement réduit (170 µm) par rapport aux sauvages (220 µm), mais un nombre similaire de follicules a été trouvé dans les deux cas (figure 23B). Les sections ovariennes sont réduites chez les femelles « stériles » par rapport aux femelles sauvages, bien que non significatives. L'analyse de la distribution du nombre de follicule par rapport à leur taille a révélé des profils distincts chez les femelles de type sauvage et les femelles stériles (figure 23C). Le nombre de gros follicules (>400 µm) est significativement réduit chez les femelles « stériles », tandis que les petits follicules (<100 µm) ont tendance à s'accumuler, suggérant une accumulation des petits follicules au détriment des gros.

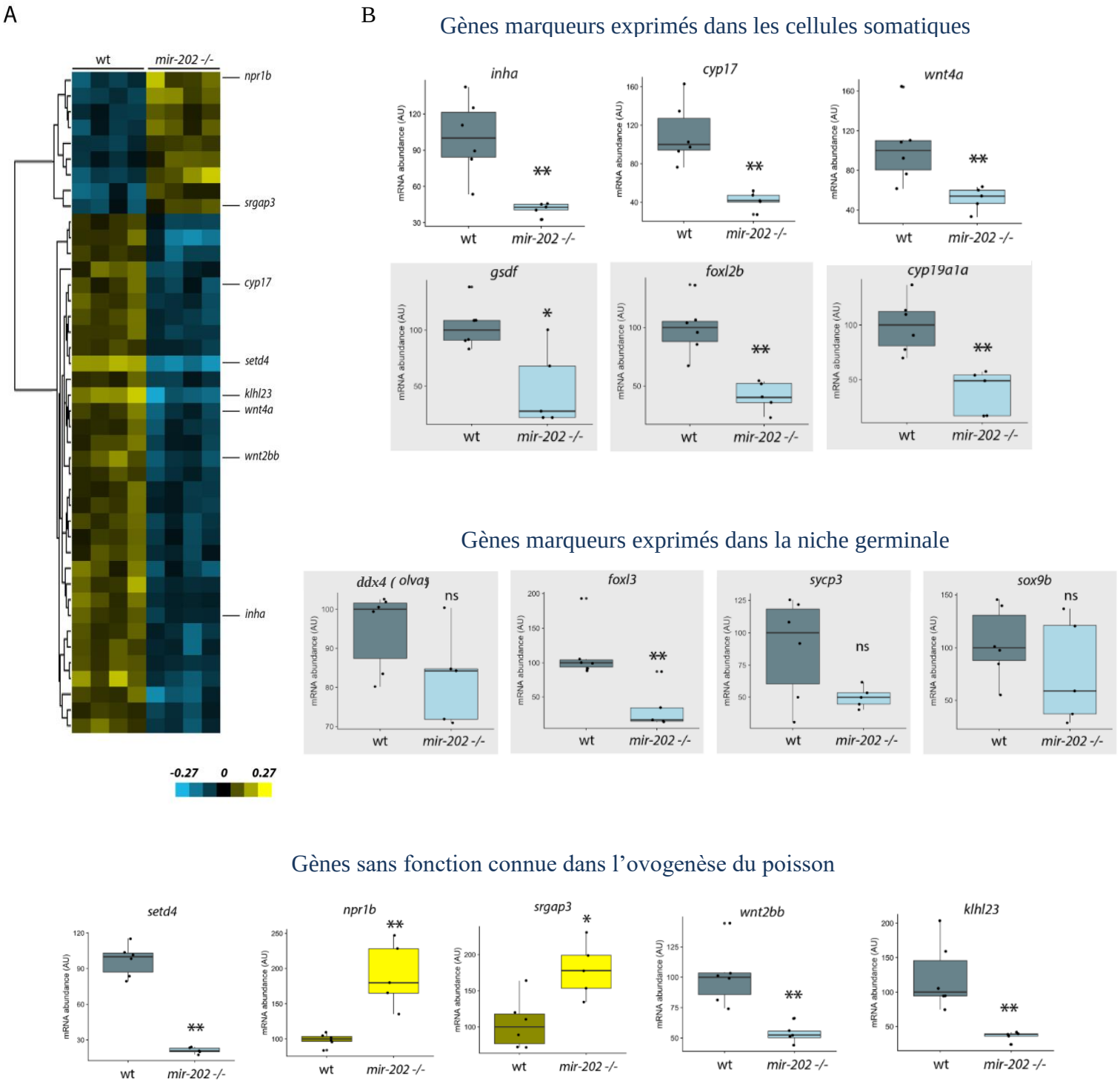


Figure 24 : Profils d'expression de l'ARNm des gènes ovariens chez les femelles mir-202 -/-. Les gènes les plus différentiellement exprimés (en blanc) et les gènes majeurs impliqués dans l'ovogenèse des poissons sélectionnés dans la littérature (en gris). (A) Cluster supervisé des gènes différentiellement exprimés. Les niveaux d'expression sont indiqués à l'aide d'une échelle de densité de couleur. Le jaune et le bleu sont utilisés pour la surexpression et la sous-expression, respectivement. Le noir est utilisé pour l'expression médiane. (B) Gènes ovariens exprimés chez des femelles juvéniles de type sauvage (n=6) et miR-202-/- (n=5) dans les cellules germinales somatiques, dans la niche germinale ou qui n'ont jamais été décrits auparavant comme des gènes ovariens clés.

3.3 Chez les adultes « sous-fertiles»

Chez les femelles adultes « sous-fertiles », qui présentent un phénotype reproductif plus doux, les ovaires ont montré un nombre significativement réduit de follicules, ainsi qu'une réduction de la surface des sections ovariennes (figure 23B). Aucune modification du diamètre folliculaire n'a cependant été observée, ce qui suggère que, malgré le fait qu'il y ait moins de follicules engagés dans la croissance, ils ont tous été capables d'atteindre leur taille finale.

Ceci a été confirmé par les profils de distribution de la taille folliculaire, qui ont montré une réduction significative importante du nombre de follicules de taille moyenne (100-400 µm de diamètre) chez les femelles « sous-fertiles » par rapport aux sauvages, et aucune accumulation de follicules de petite taille (<100 µm de diamètre, figure 23C).

Ces données suggèrent un arrêt de la progression de la croissance folliculaire chez les femelles juvéniles mir-202 -/-, conduisant à une accumulation de ovocytes de petites et moyennes tailles (c'est-à-dire des ovocytes en stade de pré-vitellogènese et vitellogénèse) au détriment des ovocytes les plus grands (post-vitellogénèse). De la même façon, les résultats obtenus chez les femelles « stériles » apportent les mêmes résultats que ceux des juvéniles en révélant une forte altération des premiers stades de la croissance folliculaire. En ce qui concerne les résultats obtenus chez les femelles adultes « sous-fertiles », ne montrant ni accumulation des petits follicules ni de modification du diamètre folliculaire, ils reflètent probablement un effet plus léger de la carence en miR-202 sur la croissance folliculaire et laisse penser qu'il y a une récupération partielle du phénotype à ce stade.

4. Dérégulation majeure des gènes ovariens clés en l'absence de miR-202

Pour mieux comprendre les voies moléculaires qui sont affectées en l'absence de miR-202, nous avons effectué une analyse transcriptomique à grande échelle sur des ovaires de femelles juvéniles sauvages et mutantes. Nous avons identifié 42 gènes différentiellement exprimés, avec un différentiel d'expression d'au moins 2, entre les ovaires de femelles sauvages et mutantes. Parmi ces 42 gènes, 9 étaient sur-exprimés et 33 étaient sous-exprimés chez les mutants (figure 24A). Les gènes les plus différentiellement exprimés ont été analysés par qPCR (figure 24B, blanc) ainsi que d'autres gènes majeurs sélectionnés dans la littérature pour leur implication dans l'ovogenèse (figure 24B, gris).

4.1 Régulation des gènes marqueurs exprimés dans les cellules somatiques

Parmi les gènes dérégulés issus de la puce microarray, il y avait trois gènes connus comme marqueurs des cellules somatiques : *inha, wnt4a* et *cyp17*. Nous avons choisi d'analyser également trois autres gènes clés des cellules somatiques connus pour leur rôle important dans la gamétogénèse : *cyp19a1a, gsdf et foxl2b.*

Les gènes *cyp19a1a* (aromatase) et *cyp17* codent pour des enzymes de la stéroidogenèse indispensables pour la production d'estradiol lors de la vitellogénèse et pour la différenciation sexuelle (Lubzens *et al.*, 2010). En ce qui concerne les gènes *gsdf* et *inh*, il s'agit de deux membres de la famille des TGFβ, famille connue pour ses nombreux acteurs de la reproduction (Monsivais *et al.*, 2017). Le gène g*sdf* est connu pour son rôle clé bien établi dans la détermination masculine chez le médaka mais également considéré pour son importance dans l'ovogenèse. L'*inha* (inhibine α) est exprimée pendant la vitellogénèse, et en particulier pendant la croissance finale de l'ovocyte du poisson zèbre (Poon *et al.,* 2009). De même, chez la perche truitée, où le complexe activine/inhibine joue un rôle important dans le métabolisme des stéroïdes et le transport des lipides pendant la maturation finale des ovocytes (Martyniuk *et al.*, 2013). Le gène *wnt4a*, membre de la grande famille de la voie de signalisation WNT (wingless-related integration site), a été montré comme exprimé dans les cellules somatiques précoces chez le poisson-zébre (Michelle *et al.*, 2019). Il jouerait un rôle dans la détermination ainsi que dans la différenciation sexuelle féminine probablement par la régulation du nombre d'ovogonies ou d'ovocytes de stade I (Michelle *et al.,* 2019). Enfin, le gène *foxl2b* qui est principalement exprimé dans l'ovaire, et plus spécifiquement exprimé dans les cellules de la granulosa de la niche germinale (Nakamoto *et al.*, 2006).

Nos résultats ont montré que tous les gènes marqueurs des cellules somatiques analysés ont été retrouvés moins exprimés chez les mutants miR-202-/-.

4.2 Régulation négative des gènes marqueurs exprimés dans la niche germinale

Aucun gène exprimé dans la niche germinale n'est ressorti des données issues de la puce microarray or nous étions intéressés de voir l'impact de l'absence de miR-202, exprimé normalement dans les cellules de la granulosa, sur la formation précoce des follicules. Pour cela nous avons sélectionné dans la littérature 4 gènes précoces de la niche germinale : *foxl3*, *sycp3*, *ddx4* et *sox9b*.

Le gène *foxl3* est un marqueur des cellules germinales durant leur division mitotique et avant l'entrée en méiose, tandis que *sycp3* est exprimé dans les cellules germinales qui sont déjà en méiose (Nishimura *et al.*, 2015 ; Iwai *et al.*, 2006). Le gène *sox9b* code pour un facteur de transcription présent dans les cellules somatiques très précoces de la niche germinale. Enfin, *ddx4* est un marqueur spécifique des cellules germinales primordiales, qui sont localisées dans la niche germinale, au milieu des cellules exprimant *sox9b* (Herpin et *al.*, 2007).

Nos résultats ont montré une sous-régulation pour le gène *foxl3*. En revanche, il n'y a pas de différence significative pour les gènes *sycp3*, *ddx4* et *sox9b* entre les ovaires de type sauvage et mutants.

4.3 Régulation d'autres gènes jamais mis en évidence dans l'ovogenèse du poisson

Parmi les gènes les plus différentiellement exprimés, l'analyse transcriptomique a révélé 5 autres candidats qui, à notre connaissance, n'ont jamais été décrits auparavant comme des acteurs moléculaires de l'ovogenèse du poisson : *wnt2bb, klhl23, setd4, npr1b et srgap3.*

Parmi eux se trouve *wnt2bb* un autre gène de la voie de signalisation WNT, qui contrairement à *wnt4a*, n'a jamais été mis en évidence dans la gamétogenèse à ce jour. En ce qui concerne *klhl23,* il fait partie des protéines de la famille KELCH qui ont été initialement caractérisées en raison de leur rôle important dans la communication entre les ovocytes et les cellules somatiques pendant l'ovogenèse chez la drosophile. On sait que les sept membres généraux de cette grande famille (plus de 30 membres) sont également exprimés dans l'ovaire de plusieurs vertébrés même s'ils restent peu étudiés (Charlier *et al.,* 2012). Le gène *setd4* (SET domain containing 4) n'a pas de rôle connu dans l'ovaire, par contre deux rapports récents ont démontré qu'il était impliqué dans la régulation de la quiescence cellulaire (Dai *et al.*, 2017 ; Ye *et al.*, 2019). En ce qui concerne le gène *npr1b* (natriuretic peptide receptor 1b), son rôle dans l'ovogenèse n'a jamais été rapporté, néanmoins le gène *npr2* de souris a déjà été détecté dans des cellules de granulosa et a montré qu'il maintenait un arrêt méiotique des ovocytes dans l'ovaire (Zhang *et al.*, 2010). Enfin, le gène *srgap3* (SLIT-ROBO Rho GTPase Activating Protein 3) est un des acteurs de la voie SLIT/ROBO avec une fonction dans la reproduction également inconnue à ce jour. Par contre plusieurs études mettent en évidence le rôle important d'autres acteurs de la voie SLIT/ROBO dans le système reproducteur. Comme chez la souris où les acteurs de cette voie ont été montré comme impliqué dans l'apoptose des cellules lutéales, qui sont les cellules devenir des cellules de la granulosa sous l'effet de l'hormone lutéinisante LH (Zhang *et al.*, 2019). Dans l'ovaire de poule, la voie SLIT/ROBO serait également nécessaire au développement folliculaire (Qin *et al.*, 2015).

Nos résultats ont montré une sous-régulation significative des gènes *wnt2bb, klhl23* et *setd4* dans les ovaires de femelles mutées par rapport aux sauvages. En revanche, nous avons observé une surexpression marquée des gènes *npr1b* et *srgap3* chez les mutants.

Les données obtenues à l'issue de la puce microarray ont mis en évidence un grand nombre de gènes dérégulés en l'absence de miR-202. D'une part la dérégulation de nombreux marqueurs des cellules de la granulosa nous permet d'affirmer que l'absence de miR-202 à un impact très précoce et direct sur ces cellules somatiques. D'autre part, l'absence de ce miARN entraine une réduction des activités des cellules germinales présentes dans la niche germinale (ovocytes précoces).

En revanche, nous n'avons mis en évidence aucune modification de l'expression de sox9b chez les mutants par rapport aux sauvages, résultats concordant avec ceux chez la souris montrant que sox9 agit en amont de mir-202 et régule son expression dans les cellules de la granulosa (Wainwright *et al.*, 2013). En ce qui concerne les gènes wnt2bb, klhl23, setd4, npr1b et srgap3, aucun n'a une fonction actuellement connue dans la reproduction chez les poissons mais les résultats obtenus laissent à penser qu'ils pourraient être de nouveaux acteurs moléculaires de l'ovogenèse chez le médaka et peut-être apporter un nouvel éclairage sur notre compréhension de ce processus biologique complexe.

5. Discussion

Dans la 2nde partie de ce travail, nous avons étudié l'implication de miR-202 dans l'ovogenèse du médaka par une analyse fonctionnelle. La forte expression prédominante dans les gonades de miR-202, ainsi que sa localisation dans l'ovaire, nous a permis de faire l'hypothèse que ce miARN pouvait être associé à un rôle majeur dans la reproduction. Une hypothèse risquée en sachant que les miARN sont souvent considérés comme de fins modulateurs des réseaux de régulation des gènes plutôt que comme des régulateurs majeurs des processus biologiques (Lai 2015). Avec pour seuls exemples des KO de miARN souvent associés à des effets phénotypiques "modestes" au niveau de l'organisme et qui ne sont fortement exacerbés que dans des conditions particulières (manipulations, stress ou maladies). Dans ce travail, nous avons démontré qu'en l'absence de miR-202 il y avait une réduction drastique du succès de la reproduction chez les medaka mâles et femelles, avec une fécondité réduite et une production d'œufs de mauvaise qualité. Nous avons donc fourni la première preuve fonctionnelle qu'un miRNA était nécessaire au succès de la reproduction chez la femelle. Au niveau ovarien, nous avons observé une altération précoce du développement folliculaire en l'absence de miR-202.

A partir de là, il serait intéressant d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de régulation de miR-202 dans l'ovaire du médaka mais également son mode d'action lors du développement folliculaire. Pour cela, je proposerai dans un 1er temps quelques voies de réflexion sur l'implication des cellules de la granulosa dans le phenotype observé, puis dans une 2nde partie je discuterai des probables gènes cibles de miR-202.

5.1 Défaut précoce du développement folliculaire

L'un des résultats les plus étonnants que nous ayons obtenu lors de cette étude est le nombre accru de follicules en pré-vitellogénèse en l'absence de miR-202 et une réduction du nombre de follicules en post-vitellogénèse. Ces résultats nous ont poussé à nous intéresser à la fonctionnalité des cellules somatiques du follicule et notamment les cellules de la granulosa, où s'exprime miR-202.

Voici quelques hypothèses pouvant expliquer l'impact de l'absence de miR-202 dans le développement folliculaire :

5.1.1 Défaut de prolifération et / ou différenciation des cellules de la granulosa ?

Nous avons montré qu'en l'absence de miR-202, l'expression de *gsdf* et *foxl2b*, gènes exprimés dans la granulosa et connus pour leur rôle de régulateur clé lors de la formation des follicules, était réduite. De même, nous avons observé une dérégulation des gènes clés pour la stéroidogenèse *cyp19a1a* et *cyp17* ainsi que de *inha* jouant un rôle critique pendant le développement folliculaire chez le poisson-zèbre. La dérégulation de ces acteurs (en particulier *gsdf* et *foxl2b*) suggère fortement que miR-202 contrôle le développement précoce des cellules de la granulosa, c'est-à-dire leur prolifération et/ou différenciation. Une des hypothèses est, qu'en l'absence de miR-202, un problème de prolifération et / ou de différenciation des cellules de la granulosa entrainerait une diminution de leur nombre. Cette diminution les empêcherait d'assurer correctement leurs activités (synthèse d'hormone, soutien et échange avec les cellules germinales, …), ce qui conduirait finalement à une altération du développement du follicule chez les mutants.

Parallèlement, il serait intéressant de regarder le niveau d'apoptose de ces cellules sur des larves mutantes et sauvages. En effet, la mise en évidence d'une surexpression de *srgap3* chez les mutants lors de l'analyse transcriptomique suggère qu'il y aurait peut-être un dérèglement dans l'apoptose de ces cellules. En effet, *srgap3* fait partie de la voie SLIT/ROBO dont plusieurs acteurs (*Slit2* et *Robo1*) ont été montrés comme essentiels dans l'apoptose des cellules lutéales, cellules « devenir » des cellules de la granulosa *(Zhang et al., 2019).*

5.1.2 Défaut de communication entre les cellules germinales et les cellules somatiques ?

Bien que présent dans les cellules de la granulosa tout au long de l'ovogenèse, miR-202 est également exprimé très précocement dans la niche germinale de l'ovaire, dans un sous-ensemble de cellules exprimant *sox9b* entourant l'ovogonie primordiale, correspondant à la présence des premiers follicules. Or, en analysant les données d'expression des gènes se situant dans la niche germinale, nous avons observé une dérégulation de *foxl3*, marqueur des cellules germinales avant leur entrée en méiose, chez les mutants. Ces résultats impliquent que miR-202 est nécessaire pour la division des cellules germinales et leur entrée en méiose dans la niche germinale en plus du développement folliculaire correct. Une des explications à cela serait qu'en l'absence de miR-202 dans la granulosa la communication entre les ovocytes et les cellules somatiques serait affectée, comme le suggère la dérégulation de *klhl23*, qui a un rôle important dans la communication entre les ovocytes et les cellules somatiques chez la drosophile (Hu *et al.,* 2014). Cette hypothèse est également soutenue par la dérégulation de *npr1b* et de *srgap3*, qui pourraient également servir de médiateurs pour les communications cellulaires dans l'ovaire (Zhang *et al.,* 2010 ; Dickinson and

Duncan, 2010). Néanmoins, aucune expression de mir-202 n'a été détectée dans les cellules germinales précoces, nous ne pouvons donc pas exclure que mir-202 soit également présent dans ces cellules, mais exprimé plus faiblement, et pourrait être impliqué directement dans la régulation de la mitose et de la méiose des cellules germinales.

5.1.3 Défaut de formation du micropyle ?

Lors de ce travail nous avons mis en évidence une fécondité ainsi qu'une viabilité réduite des œufs issus des femelles mutantes. Lors de l'observation de ces œufs nous avons mis en évidence une absence de fécondation par les spermatozoïdes, ce qui a eu pour conséquence une absence de développement embryonnaire. Au vu de ces résultats nous sommes donc intéressés à une structure appelée « micropyle » connue pour son rôle essentiel dans la fécondation et qui semble être un bon suspect dans l'explication de ce phénotype. En effet, il s'agit d'un canal étroit, présent dans le chorion de l'œuf, qui va permettre l'entrée des spermatozoïdes pour féconder l'ovule et qui est formé par les cellules somatiques au cours de la folliculogenèse (Marlow and Mullins, 2008). Dans cette partie nous émettons donc l'hypothèse que mir-202, qui est exprimé dans les cellules de la granulosa tout au long du développement folliculaire, pourrait jouer un rôle dans la formation du micropyle.

Les différentes réflexions menées dans cette partie, ainsi que celles recueillis dans la bibliographie, convergent vers l'idée que le développement altéré de l'ovogenèse précoce chez les miR-202-/- est lié à un défaut d'activité des cellules de la granulosa. Malgré tout, ces hypothèses que nous proposons dans ce chapitre reposent toutes sur l'idée que miR-202 est exprimé exclusivement dans les cellules somatiques or nous ne pouvons pas exclure qu'il soit également exprimé en faible quantité dans les cellules germinales, comme le suggère l'étude de Qiu *et al.*, ce qui ouvrirait la porte à d'autres mécanismes d'action de ce miARN (Qiu *et al.*, 2018).

5.2 Cibles potentielles de miR-202

Le phénotype observé dans cette étude fonctionnelle, faisant partie des plus sévères analysés jusqu'à présent après le knock-out d'un miRNA, peut fortement s'expliquer du fait d'un ensemble de défaut altérant les activités des cellules de la granulosa lors de l'ovogenèse. A partir des connaissances que nous avons sur les miARN, nous proposons que miR-202 puisse moduler un large réseau d'ARN dans les principales voies de régulation de l'ovogenèse, entrainant les défauts discutés dans la 1ère partie de la discussion. Dans cette 2nde partie, nous discuterons plus particulièrement de l'identification des cibles de miR-202 afin d'avoir une meilleure compréhension de son mode d'action dans le développement folliculaire.

Dans ce but, une étude *in silico* a été réalisée en collaboration avec Fabrice Legeai (INRAE/INRIA) afin de rechercher des cibles de miR-202 chez le médaka. Pour cela, une

prédiction des cibles moléculaires directes de miR-202-5p a été réalisée à l'aide de MiRanda et de TargetScan. Cette prédiction a permis de mettre en évidence 533 gènes présumés exprimés dans l'ovaire chez le médaka, dont 18 affichant un site prédit de liaison pour miR-202 dans leur région 3'UTR. Parmi ces gènes, *stat3* et *clockb* nous ont paru particulièrement interessants du fait de leur fonction. En ce qui concerne STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3), plusieurs études ont montré son importance dans le développement et la progression de nombreuses tumeurs humaines (Johnston and Grandis, 2011). STAT3 est un facteur de transcription qui, en réponse à des signaux de récepteurs de cytokines et des facteurs de croissance, régule la transcription de gènes sensibles qui bloquent l'apoptose, favorisent la prolifération et la survie des cellules, ainsi que l'angiogenèse et les métastases. Il est intéressant de noter que dans plusieurs études miR-202 a était montré comme régulé à la baisse dans différents types de cancers. Comme l'étude récente de Zhao *et al.*, sur le cancer des poumons, qui montrent que miR-202 cible et inhibe STAT3, entrainant ainsi la réduction de la viabilité, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Zhao *et al.,* 2017). Ils valident donc le fait que la baisse de miR-202 dans ces cellules augmente l'invasion des cellules cancéreuses et suggèrent que miR-202 pourrait peut-être agir comme un nouveau surpresseur de tumeur. Concernant *Clockb*, il s'agit d'un des gènes de l'horloge circadienne jouant un rôle essentiel dans la régulation des rythmes biologiques. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui contiennent une activité histone acetyltransférase intrinsèque liant l'ADN. Il a été observé une altération de la fertilité et de la fécondité chez des souris avec une déplétion de *Bmal1,* un des gènes principaux de l'horloge circadienne, néanmoins ces souris sont encore capables d'ovuler et de produire des œufs fécondables (Miller *et al.,* 2004 ; Alvarez *et al.,* 2008). Ces dernières années, d'autres preuves se sont accumulées chez les mammifères, reliant les gènes de l'horloge circadienne à la physiologie ovarienne (Sellix, 2015). Dans les cellules de la granulosa, il a été démontré que ces gènes entraînent les rythmes de certaines enzymes essentiels à la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, tels que STAR, CYP11a et l'aromatase (CYP19), gènes que nous avons trouvé dérégulés chez nos mutants miR-202-/-. Dans l'ensemble, les données existantes confirment le rôle des gènes de l'horloge circadienne dans les processus de croissance folliculaire, de synthèse des hormones stéroïdiennes et d'ovulation chez les mammifères.

Ces observations montrent que l'étude de la fonction d'un miARN est une tâche complexe. Dans la mesure où un même miARN peut cibler plusieurs ARNm, une variation dans le niveau d'un miARN peut avoir de larges répercussions sur l'expression de plusieurs gènes. Pour cette raison, les études futures chercheront à déterminer si ce sont seulement quelques ARNm cibles d'un miARN qui sont responsables de l'effet physiologique observé ou si c'est plutôt l'ensemble des ARNm cibles.

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Les cellules de tous les organismes vivants contiennent deux catégories distinctes d'ARN : les ARN codants, qui sont traduits en protéines après leur maturation, et les ARN non codants (ARNnc). Longtemps sous-estimés, les ARNnc ont connu un regain d'intérêt considérable au cours des dernières années, en raison de leur très grand nombre et des fonctions importantes qui leur sont associées. Lorsque nous avons débuté ce projet nous avons émis l'hypothèse de travail que, comme pour les gènes codant pour les protéines, une expression prédominante d'un ARNnc dans les gonades pouvait être associée à un rôle majeur dans la reproduction.

Afin de déterminer cela nous avons cherché à identifier les ARNnc ovariens chez le médaka par une analyse transcriptomique. Dans un 1er temps, nous avons mis en évidence 3 miARN avec une expression ovarienne prédominante forte. Les candidats issus de cette analyse étant peu nombreux, nous nous sommes également interessé aux piARN, dont l'impliquation dans la régulation génique a également été démontrée. Ainsi nous avons caractérisé les piARN chez le médaka, puis mis en évidence 42 piARN non liés aux TE présentant une forte expression ovarienne. Cependant même si nous n'avons actuellement aucune preuve que ces piARN soient des régulateurs géniques, et non des protecteurs du génome, c'est une piste que nous souhaitons explorer à l'avenir.

Dans une 2nde partie nous nous sommes plus particulièrement interessé au miR-202, candidat issu de la liste des miARN ovariens et déjà mis en évidence dans la littérature pour son expression dans l'ovaire de nombreuses espèces. Nous avons réalisé une étude fonctionnelle de miR-202 et montré qu'en son absence il y avait une réduction drastique du succès de la reproduction chez les medaka, avec une fécondité réduite et une production d'œufs de mauvaise qualité. Enfin, nous avons mis en évidence son rôle précoce dans le développement folliculaire. La caractérisation du phénotype, remarquable pour un miARN, de sous fertilité/infertilité associé à l'invalidation de miR-202 a fait l'objet d'une publication dans PLoS Genetics en 2018 dont je suis première auteure.

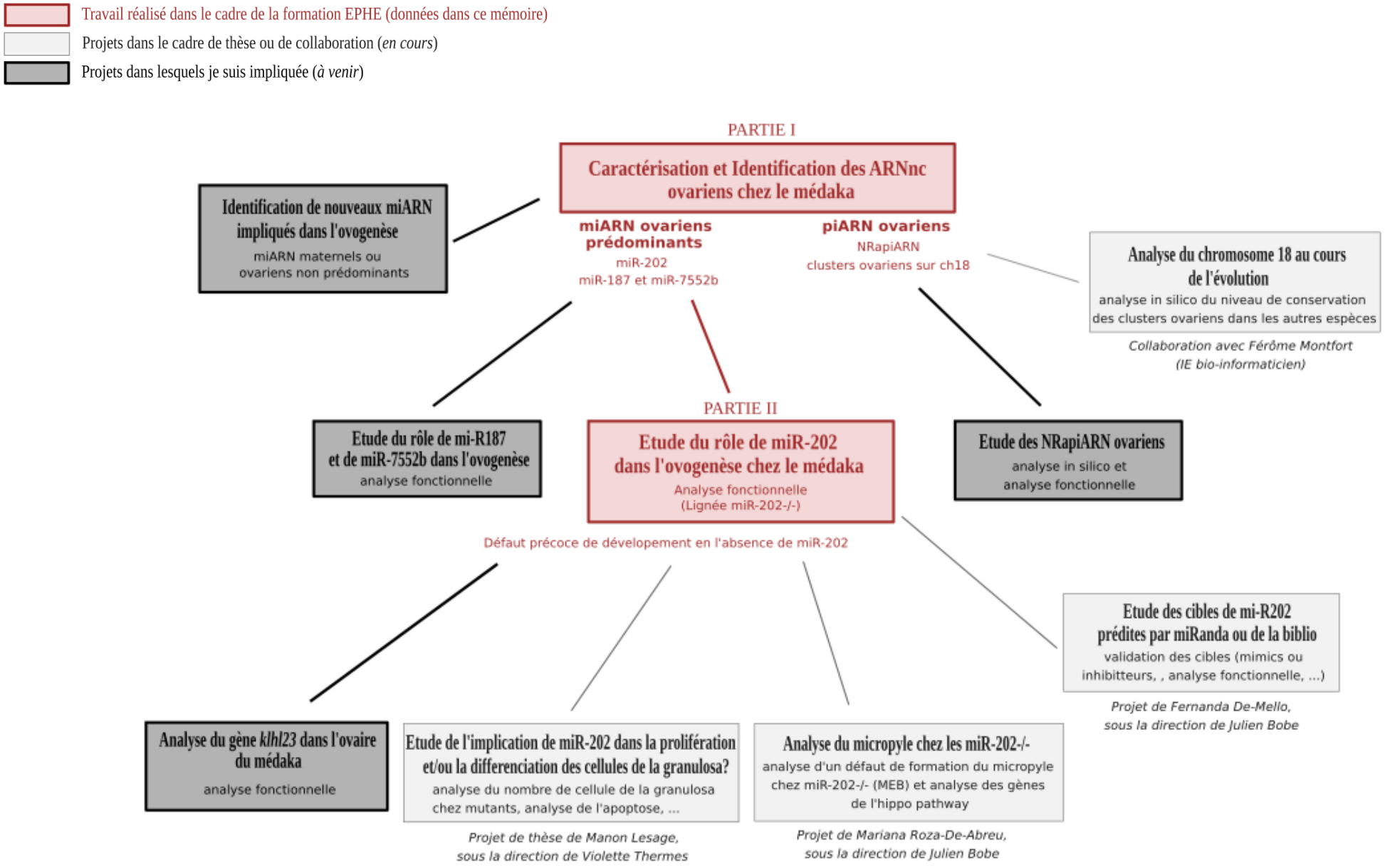


Figure 25 : Liste des projets (à venir ou en cours) à l'issue de ce travail.

PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de ce travail ont apporté plusieurs éléments forts quant à l'implication d'un ARNnc ovarien dans la reproduction. Ils ouvrent également des portes à de nombreuses nouvelles questions et hypothèses concernant les autres ARNnc ovariens ainsi que sur le mécanisme d'action de miR-202 dans la gamétogenèse. Afin d'aller plus loin dans la compréhension de la reproduction, il serait donc interessant de poursuivre l'identification de ARNnc pouvant jouer un rôle dans la régulation de l'ovogenèse, ainsi que de continuer à étudier le miR-202 afin de determiner plus précisément sa fonction dans l'ovogenèse.

Plusieurs projets résultants de ce travail sont d'ores et déjà en cours au laboratoire, certains dans le cadre de thèse ou de collaboration et d'autres dont je suis en charge (figure 25).

Les ARNnc impliqués dans l'ovogenèse

Dans la 1ère partie de ce travail, nous avons fait le choix de selectionner les ARNnc avec une forte expression prédominante ovarienne, en faisant l'hypothèse qu'une expression spécifique dans l'ovaire impliquait un rôle probable dans l'ovogenèse. En ce qui concerne les miARN, nous avons identifié 3 candidats ovariens interessants, dont notamment le miR-202 que nous avons étudié de façon plus approfondie et pour lequel nous avons montré un rôle indispensable dans le contrôle de la folliculogenèse. Pour poursuivre cette étude il serait interessant d'analyser également la fonction des deux autres miARN identifiés comme ovariens prédominants (miR-187 et miR-7552b). Dans ce cadre, j'ai d'ores et déjà commencé l'analyse du phénotype de reproduction de la lignée muatnte miR-187-/- et je prépare actuellement les guides pour les micro-injections (CRISPR/Cas9) afin de créer la lignée mutante miR-7552b-/-.

Par la suite, il serait également interessant d'élargir la liste des miARN pouvant avoir un rôle dans le développement de l'ovaire. Pour cela, les miARN fortement exprimés dans l'ovaire malgrè une forte expression dans un autre tissu (miARN non ovariens spécifiques) et les miARN exprimés dans les premiers stades de développement embryonnaire (ARN maternel) pourraient s'avérer de bons candidats. J'ai identifié une liste de miARN avec un enrichissement maternel, que je valide actuellement en analysant leur expression au cours de l'embryogenèse par qPCR.

En ce qui concerne les piARN, nous avons mis en evidence une liste de 1121 NRapiARN ovariens, non liés aux TE et une localisation unique sur le génome, dont 4 avec une forte expression ovarienne présents dans les clusters de chromosome 18, cependant n'avons pas confirmé qu'il s'agit bien de piARN jouant un rôle dans la régulation des gènes. A partir de là, il serait interessant de poursuivre l'analyse *in silico* de ces NRapiARN afin de mettre en évidence un biais dû à leur rôle de régulateur génique. Un exemple est la présence de piARN régulateurs

géniques retrouvés majoritairement dans les régions 3' et 5' UTR des gènes dans plusieurs études (Larriba et Del Mazo, 2018). Je suis en cours d'analyse de la localisation de ces NRapiARN dans le génome et j'envisage de réaliser une analyse fonctionnelle pour les piARN les plus prometteurs.

Enfin, il serait interessant de pousser plus loin l'étude des clusters ovariens remarquables du chromosome 18 dans des zones équivalentes du génome chez d'autres espèces et ainsi voir si ces régions sont conservées. Cette partie sera réalisée en collaboration avec Jérôme Montfort (IE bio-informaticien).

Analyse des défauts précoces causés par l'absence de miR-202 lors de l'ovogenèse

Dans la discussion de la 2nde partie, nous avons proposé 3 hypothèses pouvant expliquer une altération dans l'ovogenèse précoce en l'absence de miR-202 : i) un nombre de cellules de la granulosa diminué dû à un défaut de la prolifération et / ou de la différenciation de ces cellules, ii) un défaut de la mitose et / ou de la méiose des cellules germinale primordiales dû à un problème de communication entre les cellules somatiques et les cellules germinales, et enfin iii) un défaut dans la formation du micropyle empêchant la pénétration du spermatozoide dans l'œuf. Pour la suite de cette étude, et afin de déterminer de façon plus approfondie le mode d'action de miR-202 dans l'ovaire du médaka, nous envisageons d'explorer ces différentes pistes afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires conduisant à une baisse de fécondité et de qualité ovocytaire.

En ce qui concerne l'hypothèse sur la diminution des cellules de la granulosa, une étude préalable réalisée par Manon Lesage dans le cadre d'un projet de thèse portant sur « le rôle de miR-202 dans la formation des gamètes et la reproduction femelle chez le poisson » est actuellement en cours au laboratoire (projet porté par Violette Thermes). Une première approche visant à déterminer le nombre de cellule en prolifération chez des mutants miR-202-/- et chez les sauvages par immunofluorescence montrent que le nombre de cellules en prolifération est plus bas chez les mutants que chez les sauvages. Cependant ces résultats préliminaires restent à confirmer avec un plus grand nombre d'échantillon. Pour poursuivre, il serait intéressant de voir si la taille moyenne des cellules de la granulosa est la même chez les mutants que chez les sauvages. Une autre étude permettant d'analyser le niveau d'apoptose chez les médaka mutants et sauvages permettrait également de comprendre cette diminution. Pour cela une analyse avec le kit de marquage TUNEL, permettant la détection de fragmentation de l'ADN, pourrait être réalisée.

En ce qui concerne l'altération de la mitose et / ou de la méiose des cellules germinales il serait intéressant de voir s'il s'agit d'un effet direct de l'absence de miR-202 dans les cellules germinales ou s'il s'agit bien d'un problème de communication entre ces deux types cellulaires. Pour cela, j'envisage de réaliser une étude fonctionnelle du gène klhl23, membre de la famille KELCH caractérisés en raison de leur rôle important dans la communication entre les ovocytes et

les cellules somatiques pendant l'ovogenèse chez la drosophile, afin de voir si le phénotype obtenu est le même qu'en l'absence de miR-202.

Enfin, concernant un défaut de structure du micropyle, une étude préliminaire est en cours au laboratoire par Mariana Roza-De-Abreu dans le cadre d'un projet s'intéressant à la qualité des œufs (projet porté par Julien Bobe). Pour déterminer si le micropyle est fonctionnel chez les miR202-/-, une coloration des œufs au bleu de Coomasie, permettant la visualisation macroscopique du cône, a été réalisée. Cette première étude a permis de voir que les cônes étaient toujours présents dans les œufs mutants, bien qu'ils semblent être plus petits et plus courts que dans les œufs sauvages. Pour valider cette 1ère observation, les œufs mutants et wt vont être analyser par microscopie électronique à balayage afin de voir en détail la structure en forme de « cône » permettant la fécondation notamment afin de vérifier si le micropyle est bien fonctionnel ou s'il est obturé à sa bases, comme le laissent supposer nos premières observations. Si c'est bien le cas, nous envisageons alors d'étudier plus en détail la formation du micropyle en nous intéressant en particulier aux gène de l'Hippo pathway qui sont impliqués dans la différenciation ou spécification du micropyle chez le poisson-zèbre (Dingare *et al.*, 2018 ; Yi *et al*., 2019).

Etude des cibles potentielles de miR-202

Lors de l'analyse *in silico* de prédiction de cible pour miR-202 dans l'ovaire du médaka, les gènes *stat3* et *clockb* se sont avérés particulièrement intéressants. Cependant d'autres études proposent actuellement des cibles de miR-202 avec, pour certaines un mode d'action spécifique à la régulation de la folliculogénèse, et pour d'autres des mécanismes non liés aux cellules de la granulosa mais qui reste particulièrement interessante et pourrait fournir de nouveaux candidats intéressants pour la suite.

Parmi elles, une étude chez la chèvre suggère que miR-202-5p, présent dans les cellules de la granulosa, ciblerait l'ARNm TGFβR2 (Transforming growth factor, beta receptor II). En effet, ils ont montré que la dégradation de l'ARNm TGFβR2, atténuait la signalisation de la voie TGF-β/SMAD, en diminuant les niveaux de p-SMAD3 (phospho-smad3) (Ding *et al.*, 2020). *p-Smad3* ayant récemment était mis en évidence pour sa relation étroite avec l'apoptose des cellules de granulosa (Shen and Wang 2019). Ces données donnent un aperçu de l'importance de la voie de signalisation TGF-β/SMAD, qui en l'absence de miR-202-5p pourrait inhiber la folliculogenèse en régulant l'apoptose des cellules de granulosa. Pour aller plus loin, Q. Ding *et al*. ont montré que SF1 (steroidogenic factor 1) est un facteur de transcription qui se lie aux promoteurs de miR-202 et de *cyp19a1*, et qu'il réprime les niveaux de TGFβR2 et de p-SMAD3 dans les cellules de la granulosa par la transactivation du miR-202-5p. Toutes ces données sont cohérentes avec notre hypothèse sur la dérégulation de la prolifération des cellules de la granulosa / apoptose que miR-

202-5p aurait pour rôle de réguler l'apoptose des cellules de la granulosa en ciblant directement TGFβR2 pour maintenir l'expression de p-smad3 dans la voie TGF- βSMAD, et tout ça sous la régulation de SF1. Une autre voie de régulation impliquant un rôle plus précoce de miR-202 dans la migration des PGC a été mise en evidence chez le poission-zèbre (Jin *et al.*, 2019). Dans cette étude, il a été rapporté le rôle de miR-202-5p dans la migration des PGC, ainsi que la mise en évidence de l'ARNm *cdc42se1* comme cible directe de miR-202-5p. En effet, ils ont observé que lorsque *cdc42se1* est surexprimé dans les PGC, il provoque des défauts de migration de ces PGC similaires à ceux observés dans la perte des mutants miR-202-5p. De plus, ils ont montré qu'en l'absence de miR-202-5p, *cdc42se1* serait surexprimé, entrainant une inhibition de la transcription de *cdc42*, gène connu pour son rôle dans l'activation des follicules primordiaux dans les ovaires de mammifères (H. Yan et al. 2018) ainsi que pour son interaction avec l'actine, essentiel à la migration des PGC (Watson et al., 2017). L'ensemble de ces résultats suggère que miR-202-5p aurait pour rôle de réguler la migration des PGC en ciblant et en réprimant directement *cdc42se1* pour protéger l'expression de *cdc42*. Cette étude ouvre la porte sur une possible implication de miR-202 à des stades encore plus précoces que ceux mis en évidence dans notre travail. Enfin, J. Chen *et al.* ont mis en évidence *Cpe1* et *Rbfox2*, deux cibles directes de miR-202 chez la souris, et dont Rbfox2 est plus particulièrement connu pour son rôle essentiel dans la différenciation des cellules souches spermatogoniales (SSC). Ils ont ensuite utilisé une technique CRISPR-Cas9 inductible pour neutraliser miR-202 dans les SSC en culture, et ont constaté que les cellules KO initiaient prématurément une différenciation accompagnée d'une réduction de l'activité des cellules, ainsi qu'une augmentation de la mitose et de l'apoptose (Chen et al. 2017).

A partir de là, des recherches supplémentaires seraient nécessaires pour valider les interactions entre miR-202-5p et les différents gènes obtenus dans la bibliographie ou par prédiction chez le médaka : tgfβr2, cdc42se1, rbfox2, stat3 et clockb. L'étude de ces gènes nous permettrait de mieux comprendre la croissance folliculaire, la régulation de l'apoptose ainsi que la division des cellules germinales dans l'ovaire du médaka. De plus, l'étude d'un gène comme clockb qui pourrait être prometteur pour la compréhension du rythme de recrutement des follicules pendant les cycles de reproduction des médaka. Pour cela, il faudrait dans un premier temps confirmer le fait que ces gènes soient bien des cibles de miR-202-5p i) soit en clonant le 3′UTR de l'ARNm cible dans un vecteur rapporteur de la luciférase, puis analyser l'activité de la luciférase en testant des mimiques et des inhibiteurs de miR-202-5p, ii) soit en réalisant une immunoprécipitation en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine AGO, présente dans le complexe permettant le silencing de l'ARNm. Pour les candidats validés comme étant des cibles directes de miR-202, une étude fonctionnelle pourrait ensuite être réalisée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abramov R, Fu G, Zhang Y, and Peng C. 2012. “Expression and Regulation of MiR-17a and MiR-430b in Zebrafish Ovarian Follicles.” *General and Comparative Endocrinology* 188(1): 309–15.

Ahn H W, Morin R, Zhao H, Harris R, Coarfa C, Chen Z J, Milosavljevic A, Marra M , and Rajkovic A. 2010. “MicroRNA Transcriptome in the Newborn Mouse Ovaries Determined by Massive Parallel Sequencing.” *Molecular Human Reproduction* 16(7): 463–71.

Ahsan B, Kobayashi D, Yamada T, Kasahara M, Sasaki S, Saito T, Nagayasu Y, Doi K, Nakatani Y, Qu W, Jindo T, Shimada A, Naruse K, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto S I, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-i T, Takeda H, Kohara Y, and Morishita S. 2008. “UTGB/Medaka: Genomic Resource Database for Medaka Biology.” *Nucleic Acids Research* 36(SUPPL. 1): 747–52.

Aida, T. 1921. “On the Inheritance of Color in a Fresh-Water Fish, APLOCHEILUS LATIPES Temmick and Schlegel, with Special Reference to Sex-Linked Inheritance.” *Genetics* 6(6): 554–73.

Alvarez JD, Hansen A, Ord T, Bebas P, Chappell PE, Giebultowicz JM, Williams C, Moss S, Sehgal A. 2008. “The Circadian Clock Protein BMAL1 Is Necessary for Fertility and Proper Testosterone Production in Mice.” *J Biol Rhythms* 23(1): 26–36.

Aravin A, Naumova N, Tulin A, Vagin V, Rozovsky, Yakov M, Gvozdev V.2001. “Double-Stranded RNA-Mediated Silencing of Genomic Tandem Repeats and Transposable Elements in the D. Melanogaster Germline.” *Current Biology* 11(13): 1017–27.

Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein M, Kuramochi-Miyagawa S, Chien M, Russo J, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, and Tuschl T.2006. “A Novel Class of Small RNAs Bind to MILI Protein in Mouse Testes.” *Nature* 442(7099): 203–7.

Aravin A, Hannon GJ, and Brennecke J. 2007. “The Piwi-PiRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race.” *Science* 318(5851): 761–64.

Armisen J, Gilchrist MJ, Wilczynska A, Standart N, and Miska EA. 2009. “Abundant and Dynamically Expressed MiRNAs, PiRNAs, and Other Small RNAs in the Vertebrate Xenopus Tropicalis.” *Genome Research* 19(10): 1766–75.

Ashe A, Sapetschnig A, Weick EM, Mitchell J, Bagijn MP, Cording A, Doebley AL, Goldstein LD, Lehrbach NJ, Le Pen J, Pintacuda G, Sakaguchi A, Sarkies P, Ahmed S and Miska E. 2012. “PiRNAs Can Trigger a Multigenerational Epigenetic Memory in the Germline of C. Elegans.” *Cell* 150(1): 88–99.

Bagijn MP, Goldstein LD, Sapetschnig A, Weick EM, Bouasker S, Lehrbach NJ, Simard MJ, and Miska E. 2012. “Function, Targets and Evolution of Caenorhabditis Elegans PiRNAs.” *Science* 337(337).

Banerjee D and Slack F. 2002. “Control of Developmental Timing by Small Temporal Rnas: A Paradigm for Rna-Mediated Regulation of Gene Expression.” *BioEssays* 24(2): 119–29.

Bannister SC, Tizard MLV, Doran TJ, Sinclair AH, and Smith CA. 2009. “Sexually Dimorphic MicroRNA Expression During Chicken Embryonic Gonadal Development1.” *Biology of Reproduction* 81(1): 165–76.

Bannister S, Smith C, Roeszler K, Doran T, Sinclair A, and Tizard M. 2011. “Manipulation of Estrogen Synthesis Alters MIR202* Expression in Embryonic Chicken Gonads1.” *Biology of Reproduction* 85(1): 22–30.

Bartel DP. 2004. “MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.” *Cell* 116: 281-397.

Bartel DP. 2009. “MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions David.” *Cell* 136: 215-233.

Bartel DP. 2018. “Metazoan MicroRNAs.” *Cell* 173(1): 20–51.

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, and Hannon GJ. 2003. “Dicer Is Essential for Mouse Development.” *Nature Genetics* 35(3): 215–17.

Bertho S, Pasquier J, Pan Q, Le Trionnaire G, Bobe J, Postlethwait J, Pailhoux E, Scartl M, Herpin A, and Guiguen Y. 2016. “Foxl2 and Its Relatives Are Evolutionary Conserved Players in Gonadal Sex Differentiation.” *Sexual Development* 10(3): 111–29.

Beyret E, Liu N, and Lin H. 2012. “PiRNA Biogenesis during Adult Spermatogenesis in Mice Is

Independent of the Ping-Pong Mechanism." *Cell Research* 22(10): 1429–39.
Bizuayehu TT, Babiak J, Norberg B, Fernandes JMO, Johansen SD, and Babiak I. 2012. "Sex-Biased MiRNA Expression in Atlantic Halibut (Hippoglossus Hippoglossus) Brain and Gonads." *Sexual Development* 6(5): 257–66.
Bouchareb A, Le Cam A, Montfort J, Gay S, Nguyen T, Bobe J, and Thermes V. 2017. "Genome-Wide Identification of Novel Ovarian-Predominant MiRNAs: New Insights from the Medaka (Oryzias Latipes)." *Scientific Reports* 7(August 2016): 1–11.
Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, and Hannon GJ. 2007. "Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in Drosophila." *Cell* 128(6): 1089–1103.
Brodersen P and Voinnet O. 2009. "Revisiting the Principles of MicroRNA Target Recognition and Mode of Action." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(2): 141–48.
Cao Z, Mao X, and Luo L. 2019. "Germline Stem Cells Drive Ovary Regeneration in Zebrafish." *Cell Reports* 26(7): 1709-1717.e3.
Carmell MA, Girard A, Van de Kant HJG, Bourc'his D, Bestor TH, De Rooij DG, and Hannon GJ. 2007. "MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline." *Developmental Cell* 12(4): 503–14.
Charlier C, Montfort J, Chabrol O, Brisard D, Nguyen T, Le Cam A, Richard-Parpaillon L, Moreews F, Pontarotti P, Uzbekova S, Chesnel F, and Bobe J. 2012. "Oocyte-Somatic Cells Interactions, Lessons from Evolution." *BMC Genomics* 13(1).
Chen J, Cai T, Zheng C, Lin X, Wang G, Liao S, Wang X, Gan H, Zhang D, Hu X, Wang S, Li Z, Feng Y, Yang F, and Han C. 2017. "MicroRNA-202 Maintains Spermatogonial Stem Cells by Inhibiting Cell Cycle Regulators and RNA Binding Proteins." *Nucleic Acids Research* 45(7): 4142–57.
Clelland E, Kohli G, Campbell RK, Sharma S, Shimasaki S, and Peng C. 2006. "Bone Morphogenetic Protein-15 in the Zebrafish Ovary: Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning, Genomic Organization, Tissue Distribution, and Role in Oocyte Maturation." *Endocrinology* 147(1): 201–9.
Clelland E and Peng C. 2009. "Endocrine/Paracrine Control of Zebrafish Ovarian Development." *Molecular and Cellular Endocrinology* 312(1–2): 42–52.
Crespo B, Lan-Chow-Wing O, Rocha A, Zanuy S, and Gomez A. 2013. "Foxl2 and Foxl3 Are Two Ancient Paralogs That Remain Fully Functional in Teleosts." *General and Comparative Endocrinology* 194: 81–93.
Dabaja AA, Mielnik A, Robinson BD, Wosnitzer M, Schlegel PN, and Paduch DA. 2015. "Possible Germ Cell-Sertoli Cell Interactions Are Critical for Establishing Appropriate Expression Levels for the Sertoli Cell-Specific MicroRNA, MiR-202-5p, in Human Testis." *Basic and Clinical Andrology* 25(1): 1–8.
Dai L, Ye S, Li HW, Chen DF, Wang HL, Jia SN, Lin C, Yang JS, Yang F, Nagasawa H, and Yang WJ. 2017. "SETD4 Regulates Cell Quiescence and Catalyzes the Trimethylation of H4K20 during Diapause Formation in Artemia." *Molecular and Cellular Biology* 37(7): 1–17.
De Keuckelaere E, Hulpiau P, Saeys Y, Berx G, and Roy FV. 2018. "Nanos Genes and Their Role in Development and Beyond." *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(11): 1929–46.
Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, and Hannon GJ. 2004. "Processing of Primary MicroRNAs by the Microprocessor Complex." *Nature* 432(7014): 231–35.
Desvignes T, Batzel P, Sydes J, Eames BF, and Postlethwait JH. 2019. "MiRNA Analysis with Prost! Reveals Evolutionary Conservation of Organ-Enriched Expression and Post-Transcriptional Modifications in Three-Spined Stickleback and Zebrafish." *Scientific Reports* 9(1): 1–15.
Dickinson RE and Duncan WC. 2010. "The SLIT-ROBO Pathway: A Regulator of Cell Function with Implications for the Reproductive System." *Reproduction* 139(4): 697–704.
Ding Q, Jin M, Wang Y, Liu J, Kalds P, Wang Y, Yang Y, Wang X, and Chen Y. 2020. "Transactivation of MiR-202-5p by Steroidogenic Factor 1 (SF1) Induces Apoptosis in Goat Granulosa Cells by Targeting TGF β R2." *Cells* 1: 1–17.
Dingare C, Niedzwetzki A, Klemmt PA, Godbersen S, Fuentes R, Mullins MC, and Lecaudey V. 2018. "The Hippo Pathway Effector Taz Is Required for Cell Morphogenesis and Fertilization in Zebrafish." *Development* 145(22).
Dranow D, Hu K, Bird AM, Lawry ST, Adams MT, Sanchez A, Amatruda JF, and Draper BW. 2016. "Bmp15 Is an Oocyte-Produced Signal Required for Maintenance of the Adult Female Sexual Phenotype in Zebrafish." *PLoS Genetics* 12(9): 1–24.

Draper BW. 2017. “Identification of Germ-Line Stem Cells in Zebrafish.” *Methods in Molecular Biology* 1463: 103–13.

Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, Jong FH, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, and Themmen APN. 1999. “Control of Primordial Follicle Recruitment by Anti-Müllerian Hormone in the Mouse Ovary *.” *Endocrinology* 140(12): 5789–96.

Edson MA, Nagaraja AK, and Matzuk MM. 2009. “The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation.” *Endocrine Reviews* 30(6): 624–712.

Ernst C, Odom DT, and Kutter C. 2017. “The Emergence of PiRNAs against Transposon Invasion to Preserve Mammalian Genome Integrity.” *Nature Communications* 8(1): 1–9.

Gautier A, Sohm F, Joly JS, Le Gac F, and Lareyre JJ. 2011. “The Proximal Promoter Region of the Zebrafish Gsdf Gene Is Sufficient to Mimic the Spatio-Temporal Expression Pattern of the Endogenous Gene in Sertoli and Granulosa Cells1.” *Biology of Reproduction* 85(6): 1240–51.

Gebert D and Rosenkranz D. 2015. “RNA-Based Regulation of Transposon Expression.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 6(6): 687–708.

Goh WSS, Falciatori I, Tam OH, Burgess R, Meikar O, Kotaja N, Hammell M, and Hannon GJ. 2015. “PiRNA-Directed Cleavage of Meiotic Transcripts Regulates Spermatogenesis.” *Genes and Development* 29(10): 1032–44.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, and Shiekhattar R. 2004. “The Microprocessor Complex Mediates the Genesis of MicroRNAs.” *Nature* 432(7014): 235–40.

Griffiths-Jones S, Saini HK, Dongen SV, and Enright AJ. 2008. “MiRBase: Tools for MicroRNA Genomics.” *Nucleic Acids Research* 36(SUPPL. 1): 154–58.

Grivna ST, Beyret E, Wang Z, and Lin H. 2006. “A Novel Class of Small RNAs in the Mouse Permatogenic Cells.Pdf.” *Gene dev.* 20(13): 1709–14.

Guan G, Sun K, Zhang X, Zha X, Li M, Yan Y, Wang Y, Chen J, Yi M, and Hong Y. 2017. “Developmental Tracing of Oocyte Development in Gonadal Soma-Derived Factor Deficiency Medaka Using a Transgenic Approach.” *Mechanisms of Development* 143: 53–61.

Ha M and Kim VN. 2014. “Regulation of MicroRNA Biogenesis.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(8): 509–24.

He P, Wei P, Chen X, Lin Y, and Peng J. 2019. “Identification and Characterization of MicroRNAs in the Gonad of Trachinotus Ovatus Using Solexa Sequencing.” *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 30(March): 312–20.

Herpin A, Rohr S, Riedel D, Kluever N, Raz E, and Schartl M. 2007. “Specification of Primordial Germ Cells in Medaka (Oryzias Latipes).” *BMC Developmental Biology* 7: 1–10.

Hiramatsu N, Todo T, Sullivan CV, Schilling J, Reading BJ, Matsubara T, Ryu YW, Mizuta H, Luo W, Nishimiya O, Wu M, Mushirobira Y, Yilmaz O, and Hara A. 2015. “Ovarian Yolk Formation in Fishes: Molecular Mechanisms Underlying Formation of Lipid Droplets and Vitellogenin-Derived Yolk Proteins.” *General and Comparative Endocrinology* 221: 9–15.

Hirano T, Iwasaki YW, Lin ZYC, Imamura M, Seki NM, Sasaki E, Saito K, Okano H, Siomi MC, and Siomi H. 2014. “Small RNA Profiling and Characterization of PiRNA Clusters in the Adult Testes of the Common Marmoset, a Model Primate.” *Rna* 20(8): 1223–37.

Houston DW and King ML. 2000. “A Critical Role for Xdazl a Germ Plasm-Localized RNA, in the Differentiation of Primordial Germ Cells in Xenopus.” *Development* 127(3): 447–56.

Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, Elst HVD, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RHA, Hannon GJ, and Ketting RF. 2007. “A Role for Piwi and PiRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish.” *Cell* 129(1): 69–82.

Hu Q, Zhu Y, Liu Y, Wang N, and Chen S. 2014. “Cloning and Characterization of Wnt4a Gene and Evidence for Positive Selection in Half-Smooth Tongue Sole (Cynoglossus Semilaevis).” *Scientific Reports* 4: 1–9.

Hwang HW and Mendell JT. 2006. “MicroRNAs in Cell Proliferation, Cell Death, and Tumorigenesis.” *British Journal of Cancer* 94(6): 776–80.

Ishizu H, Siomi H, and Siomi MC. 2012. “Biology of Piwi-Interacting RNAs: New Insights into Biogenesis and Function inside and Outside of Germlines.” *Genes and Development* 26(21): 2361–73.

Iwai T, Yoshii A, Yokota T, Sakai C, Hori H, Kanamori A, and Yamashita M. 2006. “Structural Components of the Synaptonemal Complex, SYCP1 and SYCP3, in the Medaka Fish Oryzias

Latipes." *Experimental Cell Research* 312(13): 2528–37.
Iwamatsu T, Ohta T, Oshima E, and Sakap N. 1988. "Oogenesis in the Medaka Oryzias Latipes-Stages of Oocyte Development". Z*oological science*
Jalabert B. 2005. "Particularities of Reproduction and Oogenesis in Teleost Fish Compared to Mammals." *Reproduction, nutrition, development* 45: 261–79.
Jia KT, Zhang J, Jia P, Zeng L, Jin Y, Yuan Y, Chen J, Hong Y, and Yi M. 2015. "Identification of MicroRNAs in Zebrafish Spermatozoa." *Zebrafish* 12(6): 387–97.
Jin Y, Liu W, Xiang Y, Zhang W, Zhang H, Jia K, and Yi M. 2019. "Maternal MiR-202-5p Is Required for Zebrafish Primordial Germ Cell Migration by Protecting Small GTPase Cdc42." *Journal of Molecular Cell Biology*.
Johnston PA and Grandis JR. 2011. "STAT3 Signaling: Anticancer Strategies and Challenges." *Molecular Interventions* 11(1): 18–26.
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 Development1." *Biology of Reproduction*.
Kamminga LM, Luteijn MJ, Broeder MJD, Redl S, Kaaij LJT, Roovers EF, Ladurner P, Berezikov E, and Ketting RF. 2010. "Hen1 Is Required for Oocyte Development and PiRNA Stability in Zebrafish." *EMBO Journal* 29(21): 3688–3700.
Kawaoka S, Izumi N, Katsuma S, and Tomari Y. 2011. "3' End Formation of PIWI-Interacting RNAs In Vitro." *Molecular Cell* 43(6): 1015–22.
Kirchmaier S, Naruse K, Wittbrodt J, and Loosli F. 2015. "The Genomic and Genetic Toolbox of the Teleost Medaka (Oryzias Latipes)." *Genetics* 199, 905-918.
Klattenhoff C and Theurkauf W. 2008. "Biogenesis and Germline Functions of PiRNAs." *Development* 135(1): 3–9.
Klüver N, Pfennig F, Pala I, Storch K, Schlieder M, Froschauer A, Gutzeit H, and Schartl M. 2007. "Differential Expression of Anti-Müllerian Hormone (Amh) and Anti-Müllerian Hormone Receptor Type II (AmhrII) in the Teleost Medaka." *Developmental Dynamics* 236(1): 271–81.
Kneitz S, Mishra RR, Chalopin D, Postlethwait J, Warren WC, Walter RB, and Schartl M. 2016. "Germ Cell and Tumor Associated PiRNAs in the Medaka and Xiphophorus Melanoma Models." *BMC Genomics* 17(1): 1–13.
Kossack M, High SK, Hopton RE, Yan YL, Postlethwait JH, and Draper BW. 2019. "Female Sex Development and Reproductive Duct." *Genetics* 211(January): 219–33.
Kotelnikov RN, Klenov MS, Rozovsky YM, Olenina LV, Kibanov MV, and Gvozdev VA. 2009. "Peculiarities of PiRNA-Mediated Post-Transcriptional Silencing of Stellate Repeats in Testes of Drosophila Melanogaster." *Nucleic Acids Research* 37(10): 3254–63.
Ku HY and Lin H. 2014. "PIWI Proteins and Their Interactors in PiRNA Biogenesis, Germline Development and Gene Expression." *National Science Review* 1(2): 205–18.
Lacey JL, Carletti MZ, and Christenson LK. 2009. "Role of Dicer in Female Fertility." *Trends Endocrinol Metab.* 20(6): 265–72.
Lai EC. 2015. "Two Decades of MiRNA Biology: Lessons and Challenges." *Rna* 21(4): 675–77.
Landgraf P *et al.* 2007. "A Mammalian MicroRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing." *Cell* 129(7): 1401–14.
Larriba E and del Mazo J. 2018. "An Integrative PiRNA Analysis of Mouse Gametes and Zygotes Reveals New Potential Origins and Gene Regulatory Roles." *Scientific Reports* 8(1): 16–18.
Lau K, Lai KP, Bao JYJ, Zhang N, Tse A, Tong A, Li JW, Lok S, Kong RYC, Lui WY, Wong A, Wu RSS. 2014. "Identification and Expression Profiling of MicroRNAs in the Brain, Liver and Gonads of Marine Medaka and in Response to Hypoxia." *PLoS ONE* 9(10): 7–8.
Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, and Kingston RE. 2006. "Characterization of the PiRNA Complex from Rat Testes." *Science* 313(5785): 363–67.
Lee HC, Gu W, Shirayama M, Youngman E, Conte Jr D, and Mello CC. 2012. "C. Elegans PiRNAs Mediate the Genome-Wide Surveillance of Germline Transcripts." *Cell* 150(1): 78–87.
Lee R, Feinbaum R, and Ambros V. 1993. "The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14." *Cell* 75(75): 843–54.
Lei L, Jin S, Gonzalez G, Behringer RR, and Woodruff TK. 2010. "The Regulatory Role of Dicer in Folliculogenesis in Mice." *Molecular and Cellular Endocrinology* 315(1–2): 63–73.
Lewis SH, Quarles KA, Yang Y, Tanguy M, Frézal L, Smith SA, Sharma PP, Cordaux R, Gilbert C,

Giraud I, Collins DH, Zamore PD, Miska EA, Sarkies P, and Jiggins FM. 2018. “Pan-Arthropod Analysis Reveals Somatic PiRNAs as an Ancestral Defence against Transposable Elements.” *Nat Ecol Evol.* 2(1): 174–81.

Li J and Cheng CHK. 2018. “Evolution of Gonadotropin Signaling on Gonad Development: Insights from Gene Knockout Studies in Zebrafish.” *Biology of Reproduction* 99(4): 686–94.

Li J and Ge W. 2020. “Zebrafish as a Model for Studying Ovarian Development: Recent Advances from Targeted Gene Knockout Studies.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 507: 110778.

Li M, Zhu F, Li Z, Hong N, and Hong Y. 2016. “Dazl Is a Critical Player for Primordial Germ Cell Formation in Medaka.” *Scientific Reports* 6: 1–7.

Li Q, Du X, Pan Z, Zhang L, and Li Q. 2018. “The Transcription Factor SMAD4 and MiR-10b Contribute to E2 Release and Cell Apoptosis in Ovarian Granulosa Cells by Targeting CYP19A1.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 476: 84–95.

Li SC, Chan WC, Ho MR, Tsai KW, Hu LY, Lai CH, Hsu CN, Hwang PP, and Lin WC. 2010. “Discovery and Characterization of Medaka MiRNA Genes by next Generation Sequencing Platform.” *BMC Genomics* 11(SUPPL. 4): S8.

Li XZ, Roy CK, Moore MJ, and Zamore PD. 2013. “Defining PiRNA Primary Transcripts.” *Cell Cycle* 12(11): 1657–58.

Liang Y, Ridzon D, Wong L, and Chen C. 2007. “Characterization of MicroRNA Expression Profiles in Normal Human Tissues.” *BMC Genomics* 8: 1–20.

Lin H. 1997. “The Tao of Stem Cells in the Germline.” *Annual Review of Genetics* 31(1): 455–91.

Lin Q, Mei J, Li Z, Zhang X, Zhou L, and Gui JF. 2017. “Self-Renewal and Differentiation of Male Germ Cells.” *Genetics* 207(November): 1007–22.

Ling YH, Ren CH, Guo XF, Xu LN, Huang YF, Luo JC, Zhang YH, Zhang XR, and Zhang ZJ. 2014. “Identification and Characterization of MicroRNAs in the Ovaries of Multiple and Uniparous Goats (Capra Hircus) during Follicular Phase.” *BMC Genomics* 15(1): 1–10.

Lubzens E, Young G, Bobe J, and Cerdà J. 2010. “Oogenesis in Teleosts: How Fish Eggs Are Formed.” *General and Comparative Endocrinology* 165(3): 367–89.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, and Kutay U. 2004. “Nuclear Export of MicroRNA Precursors.” *Science* 303(5654): 95–98.

Marlow FL and Mullins MC. 2008. “Bucky Ball Functions in Balbiani Body Assembly and Animal-Vegetal Polarity in the Oocyte and Follicle Cell Layer in Zebrafish.” *Dev Biol* 321(1): 40–50.

Martyniuk CJ, Prucha MS, Doperalski NJ, Antczak P, Kroll KJ, Falciani F, Barber DS, and Denslow ND. 2013. “Gene Expression Networks Underlying Ovarian Development in Wild Largemouth Bass (Micropterus Salmoides).” *PLoS ONE* 8(3).

Michalak, Pawel, and Malone JH. 2008. “Testis-Derived MicroRNA Profiles of African Clawed Frogs (Xenopus) and Their Sterile Hybrids.” *Genomics* 91(2): 158–64.

Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, and Takahashi JS. 2004. “Circadian Clock Mutation Disrupts Estrous Cyclicity and Maintenance of Pregnancy.” *Current Biology* 14(15): 1367–73.

Monsivais D, Matzuk MM, and Pangas SA. 2017. “The TGF-β Family in the Reproductive Tract.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9(10): 1–33.

Murchison EP, Stein P, Xuan Z, Pan H, Zhang MQ, Schultz RM, and Hannon GJ. 2007. “Critical Roles for Dicer in the Female Germline.” *Genes and Development* 21(6): 682–93.

Nagahama Y. 1994. “Endocrine Regulation of Gametogenesis in Fish.” *International Journal of Developmental Biology* 38(2): 217–29.

Nagahama Y and Yamashita M. 2008. “Regulation of Oocyte Maturation in Fish.” *Development Growth and Differentiation* 50(SUPPL. 1).

Nagao A, Mituyama T, Huang H, Chen D, Siomi MC, and Siomi H. 2010. “Biogenesis Pathways of PiRNAs Loaded onto AGO3 in the Drosophila Testis.” *Rna* 16(12): 2503–15.

Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, Nagahama Y, and Shibata N. 2006. “Molecular Cloning and Analysis of Gonadal Expression of Foxl2 in the Medaka, Oryzias Latipes.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344(1): 353–61.

Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Higashijima S, and Tanaka M. Identification. 2010. “Identification of Germline Stem Cells in the Ovary of the Teleost Medaka.” *Science* 1561(2004).

Nakamura YT. 2018. “All Oocytes Attach to the Dorsal Ovarian Epithelium in the Ovary of Medaka, Oryzias Latipes.” *Zoological Science* 35(4): 306–13.

Nishida KM, Saito K, Mori T, Kawamura Y, Nagami-Okada T, Inagaki S, Siomi H, and Siomi MC. 2007. “Gene Silencing Mechanisms Mediated by Aubergine-PiRNA Complexes in Drosophila Male Gonad.” *Rna* 13(11): 1911–22.

Nishimura T and Tanaka M. 2016. “The Mechanism of Germline Sex Determination in Vertebrates.” *Biology of Reproduction* 95(1): 30–30.

Nishimura T, Sato T, and Yamamoto Y. 2015. “Foxl3 Is a Germ Cell Intrinsic Factor Involved in Sperm Egg Fate Decision in Medaka.” (June): 1–7.

Poon SK, So WK, Yu X, Liu L, and Ge W. 2009. “Characterization of Inhibin α Subunit (Inha) in the Zebrafish: Evidence for a Potential Feedback Loop between the Pituitary and Ovary.” *Reproduction* 138(4): 709–19.

Praher D, Zimmermann, Genikhovich G, Columbus-Shenkar Y, Modepalli V, Aharoni R, Moran Y, and Technau U. 2017. “Characterization of the PiRNA Pathway during Development of the Sea Anemone Nematostella Vectensis.” *RNA Biology* 14(12): 1727–41.

Presslauer C, Bizuayehu TT, Kopp M, Fernandes JMO, and Babiak I. 2017. “Dynamics of MiRNA Transcriptome during Gonadal Development of Zebrafish.” *Scientific Reports*.

Qin N, Fan XC, Zhang YY, Xu XX, Tyasi TL, Jing Y, Mu F, Wei ML, and Xu RF. 2015. “New Insights into Implication of the SLIT/ROBO Pathway in the Prehierarchical Follicle Development of Hen Ovary.” *Poultry Science* 94(9): 2235–46.

Qiu W, Zhu Y, Wu Y, Yuan C, Chen K, and Li Mingyou. 2018. “Identification and Expression Analysis of MicroRNAs in Medaka Gonads.” *Gene*.

Rae Chi, Kelly. 2016. “The Dark Side of The Human Genome.” *Nature*: 275–77.

Raz, Erez. 2003. “Primordial Germ-Cell Development: The Zebrafish Perspective.” *Nature Reviews Genetics* 4(9): 690–700.

Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, Antony C, Sachidanandam R, and Pillai RS. 2011. “Miwi Catalysis Is Required for PiRNA Amplification-Independent LINE1 Transposon Silencing.” *Nature* 480(7376): 264–67.

Robine N, Lau N, Balla S, Jin Z, Okamura K, Kuramochi-Miyagawa S, Blower MD, and Lai EC. 2009. “A Broadly Conserved Pathway Generates 3’ UTR-Directed Primary PiRNAs.” *Current Biology* 19(24): 2066–76.

Rodríguez-Marí A, Yan YL, BreMiller RA, Wilson C, Canestro C, and Postlethwait JH. 2005. “Characterization and Expression Pattern of Zebrafish Anti-Müllerian Hormone Relative to Sox9a, Sox9b, and Cyp19a1a, during Gonad Development.” *Gene Expression Patterns* 5: 655–67.

Rojas-Rıós P and Simonelig M. 2018. “PiRNAs and PIWI Proteins: Regulators of Gene Expression in Development and Stem Cells.” *Development* 145(17).

Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, and Cooke HJ. 1997. “The Mouse Dazla Gene Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Gametogenesis.” *Nature* 389(6646): 73–77.

Russell S, Patel M, Gilchrist G, Stalker L, Gillis D, Rosenkranz D, and LaMarre J. 2016. “Bovine PiRNA-like RNAs Are Associated with Both Transposable Elements and MRNAs.” *Reproduction* 153(3): 305–18.

Saito K, Nishida KM, Mori T, Kawamura Y, Miyoshi K, Nagami T, Siomi H, and Siomi MC. 2006. “Specific Association of Piwi with RasiRNAs Derived from Retrotransposon and Heterochromatic Regions in the Drosophila Genome.” *Genes and Development* 20(16): 2214–22.

Sarkies P, Selkirk ME, Jones JT, Blok V, Boothby T, Goldstein B, Hanelt B, Ardila-Garcia A, Fast NM, Schiffer PM, Kraus C, Taylor MJ, Koutsovoulos G, Blaxter ML, and Miska EA. 2015. “Ancient and Novel Small RNA Pathways Compensate for the Loss of PiRNAs in Multiple Independent Nematode Lineages.” *PLoS Biology* 13(2): 1–20.

Sawatari E, Shikina S, Takeuchi T, and Yoshizaki G. 2007. “A Novel Transforming Growth Factor-β Superfamily Member Expressed in Gonadal Somatic Cells Enhances Primordial Germ Cell and Spermatogonial Proliferation in Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss).” *Developmental Biology* 301(1): 266–75.

Sellix MT. 2015. “Circadian Clock Function in the Mammalian Ovary.” *Journal of Biological Rhythms* 30(1): 7–19.

Selman K, Wallace RA, Sarka A, and Qi X. 1993. “Stages of Oocyte Development in the Zebrafish, Brachydanio Rerio.” *Journal of Morphology* 218(2): 203–24.

Seth M, Shirayama M, Gu W, Ishidate T, Conte Jr D, and Mello CC. 2013. “The C. Elegans CSR-1 Argonaute Pathway Counteracts Epigenetic Silencing to Promote Germline Gene Expression.” *Dev cell* 27(6): 656–63.

Shen H and Wang Y. 2019. “Activation of TGF-B1/Smad3 Signaling Pathway Inhibits the Development of Ovarian Follicle in Polycystic Ovary Syndrome by Promoting Apoptosis of Granulosa Cells.” *Journal of Cellular Physiology* 234(7): 11976–85.

Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, Nagahama Y, and Hamaguchi S. 2000. “The Vasa-like Gene, Olvas, Identifies the Migration Path of Primordial Germ Cells during Embryonic Body Formation Stage in the Medaka, Oryzias Latipes.” *Development Growth and Differentiation* 42(4): 317–26.

Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T, Hata K, Martin SL, Noce T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sasaki H, Pillai RS, Nakatsuji N, and Chuma S. 2009. “The TDRD9-MIWI2 Complex Is Essential for PiRNA-Mediated Retrotransposon Silencing in the Mouse Male Germline.” *Developmental Cell* 17(6): 775–87.

Staton AA, Knaut H, and Giraldez AJ. 2011. “MiRNA Regulation of Sdf1 Chemokine Signaling Provides Genetic Robustness to Germ Cell Migration Alison.” *Nat Genet. 2011* 43(3): 204–11.

Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, and Yu Q. 2015. “MicroRNAs in Apoptosis, Autophagy and Necroptosis.” *Oncotarget* 6(11): 8474–90.

Tao W, Sun L, Shi H, Cheng Y, Jiang D, Fu B, Conte MA, Gammerdinger WJ, Kocher TD, and Wang D. 2016. “Integrated Analysis of MiRNA and MRNA Expression Profiles in Tilapia Gonads at an Early Stage of Sex Differentiation.” *BMC Genomics* 17(1): 1–13.

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(5637): 1239–41.

Wainwright E, Jorgensen JS, Kim Y, Truong V, Bagheri-Fam S, Davidson T, Svingen T, Fernandez-Valverde SL, McClelland KS, Taft RJ, Harley VR, Koopman P, and Wilhelm D. 2013. “SOX9 Regulates MicroRNA MiR-202-5p/3p Expression During Mouse Testis Differentiation1.” *Biology of Reproduction* 89(2): 1–12.

Wallace RA and Selman K. 1990. “Ultrastructural Aspects of Oogenesis and Oocyte Growth in Fish and Amphibians.” *Journal of Electron Microscopy Technique* 16(3): 175–201.

Wang CL, Wang ZP, Wang JQ, Li MY, and Chen XW. 2016. “Identification of Candidate PiRNAs in the Gonads of Paralichthys Olivaceus (Japanese Flounder).” *Zoological research* 37(5): 301–6.

Watson JR, Owen D, and Mott HR. 2017. “Cdc42 in Actin Dynamics: An Ordered Pathway Governed by Complex Equilibria and Directional Effector Handover.” *Small GTPases* 8(4): 237–44.

Weber DN and Spieler RE. 1987. “Effects of the Light-Dark Cycle and Scheduled Feeding on Behavioral and Reproductive Rhythms of the Cyprinodont Fish, Medaka, Oryzias Latipes.” *Experientia* 43(6): 621–24.

Wedeles CJ, Wu MZ, and Claycomb JM. 2013. “A Multitasking Argonaute: Exploring the Many Facets of C. Elegans CSR-1.” *Chromosome Research* 21(6–7): 573–86.

Williams Z, Morozov P, Mihailovic A, Lin C, Puvvula PK, Juranek S, Rosenwaks Z, and Tuschl T. 2015. “Discovery and Characterization of PiRNAs in the Human Fetal Ovary.” *Cell Reports* 13(4): 854–63.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, and Diederichs S. 2009. “Many Roads to Maturity: MicroRNA Biogenesis Pathways and Their Regulation.” *Nature Cell Biology*.

Wittbrodt J, Shima A, and Schartl M. 2002. “Medaka - A Model Organism from the Far East.” *Nature Reviews Genetics*.

Wong QWL, Sun MA, Lau SW, Parsania C, Zhou S, Zhong S, and Ge W. 2018. “Identification and Characterization of a Specific 13-MiRNA Expression Signature during Follicle Activation in the Zebrafish Ovary.” *Biology of Reproduction*.

Wu X and Matzuk MM. 2002. “GDF-9 and BMP-15: Oocyte Organizers.” *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 3(1): 27–32.

Xiao J, Zhong H, Zhou Y, Yu F, Gao Y, Luo Y, Tang Z, Guo Z, Guo E, Gan X, Zhang M, and Zhang Y. 2014. “Identification and Characterization of MicroRNAs in Ovary and Testis of Nile Tilapia (Oreochromis Niloticus) by Using Solexa Sequencing Technology.” *PLoS ONE* 9(1).

Xu HY, Li MY, Gui JF, and Hong YH. 2010. “Fish Germ Cells.” *Sci China Life Sci* 53(4): 435–46.

Xu L, Guo Q, Chang G, Qiu L, Liu X, Bi Y, Zhang Y, Wang H, Lu W, Ren L, Chen Y, Zhang Y, Xu Q, and Chen G. 2017. “Discovery of MicroRNAs during Early Spermatogenesis in Chicken.” *PLoS*

ONE 12(5).
Xu S, Linher-Melville K, Yang BB, Wu D, and Li J. 2011. “Micro-RNA378 (MiR-378) Regulates Ovarian Estradiol Production by Targeting Aromatase.” *Endocrinology* 152(10): 3941–51.
Yan H, Zhang J, Wen J, Wang Y, Niu W, Teng Z, Zhao T, Dai Y, Zhang Y, Wang C, Qin Y, Xia G, and Zhang H. 2018. “CDC42 Controls the Activation of Primordial Follicles by Regulating PI3K Signaling in Mouse Oocytes.” *BMC Biology* 16(1): 1–16.
Yan YL, Desvignes T, BreMiller R, Wilson C, Dillon D, High S, Draper B, Buck CL, and Postlethwait J. 2017. 246 "The Gonadal Soma Controls Ovarian Follicle Proliferation through Gsdf in Zebrafish." *Dev Dyn* 246(11)
Yang Q, Hua J, Wang L, Xu B, Zhang H, Ye N, Zhang Z, Yu D, Cooke HJ, Zhang Y, and Shi Q. 2013. “MicroRNA and PiRNA Profiles in Normal Human Testis Detected by Next Generation Sequencing.” *PLoS ONE* 8(6).
Yang S, Wang S, Luo A, Ding T, Lai Z, Shen W, Ma X, Cao C, Shi L, Jiang J, Rong F, Ma L, Tian Y, Du X, Lu Y, Li Y, and Wang S. 2013. “Expression Patterns and Regulatory Functions of MicroRNAs during the Initiation of Primordial Follicle Development in the Neonatal Mouse Ovary.” *Biology of Reproduction* 89(5): 1–11.
Yang YJ, Wang Y, Li Z, Zhou L, and Gui JF. 2017. “Sequential, Divergent, and Cooperative Requirements of Foxl2a and Foxl2b in Ovary Development and Maintenance of Zebrafish.” *Genetics* 205(4): 1551–72.
Ye S, Ding YF, Jia WH, Liu XL, Feng JY, Zhu Q, Cai SL, Yang YS, Lu QY, Huang XT, Yang JS, Jia SN, Ding GP, Wang YH, Zhou JJ, Chen YD, and Yang WJ. 2019. “SET Domain-Containing Protein 4 Epigenetically Controls Breast Cancer Stem Cell Quiescence.” *Cancer Research* 79(18): 4729–43.
Yi R, Qin Y, Macara IG, and Cullen BR. 2003. “Exportin-5 Mediates the Nuclear Export of Pre-MicroRNAs and Short Hairpin RNAs.” *Genes and Development* 17(24): 3011–16.
Yi X, Yu J, Ma C, Dong G, Shi W, Li H, Li L, Luo L, Sampath K, Ruan H, and Huang H. 2019. “The Effector of Hippo Signaling, Taz, Is Required for Formation of the Micropyle and Fertilization in Zebrafish.” *PLoS Genetics* 15(1): 1–18.
Yin Y, Tang H, Liu Y, Chen Y, Li G, Liu X, and Lin H. 2017. “Targeted Disruption of Aromatase Reveals Dual Functions of Cyp19a1a during Sex Differentiation in Zebrafish.” *Endocrinology* 158(9): 3030–41.
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.” *Development* 124(16): 3157–65.
Yuan H and Yamashita YM. 2010. “Germline Stem Cells: Stems of the next Generation.” *Current Opinion in Cell Biology* 22(6): 730–36.
Yuan L, Li L, Zhang X, Jiang H, and Chen J. 2019. “Identification and Differential Expression of Pirnas in the Gonads of Amur Sturgeon (Acipenser Schrenckii).” *PeerJ* 2019(4): 1–17.
Zhai G, Shu T, Xia Y, Lu Y, Shang G, Jin X, He J, Nie P, and Yin Z. 2018. “Characterization of Sexual Trait Development in Cyp17a1-Deficient Zebrafish.” *Endocrinology* 159(10): 3549–62.
Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, and Eppig JJ. 2010. “Granulosa Cell Ligand NPPC and Its Receptor NPR2 Maintain Meiotic Arrest in Mouse Oocytes.” *Science* October(330): 366–69.
Zhang H, Jiang X, Zhang Y, Xu B, Hua J, Ma T, Zheng W, Sun R, Shen W, Cooke HJ, Hao Q, Qiao J, and Shi Q. 2014. “MicroRNA 376a Regulates Follicle Assembly by Targeting Pcna in Fetal and Neonatal Mouse Ovaries.” *Reproduction* 148(1): 43–54.
Zhang J, Liu W, Jin Y, Jia P, Jia K, and Yi M. 2017. “MiR-202-5p Is a Novel Germ Plasm-Specific MicroRNA in Zebrafish.” *Scientific Reports* 7(1): 1–7.
Zhang P, Kang JY, Gou LT, Wang J, Xue Y, Skogerboe G, Dai P, Huang DW, Chen R, Fu XD, Liu MF, and He S. 2015. “MIWI and PiRNA-Mediated Cleavage of Messenger RNAs in Mouse Testes.” *Cell Research* 25(2): 193–207.
Zhang XJ, Mi MY, Hao WL, and Gao BL. 2019. “Slit/Robo Pathway Participates in Luteal Cells Apoptosis.” *Acta Physiologica Sinica* 71(20160801): 287–93.
Zhao Z, LV B, Zhang L, Zhao N, and LV Y. 2017. “MiR-202 Functions as a Tumor Suppressor in Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting STAT3.” *Molecular Medicine Reports* 16(2): 2281–89.
Zhou X, Zuo Z, Zhou F, Zhao W, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Cheng H, and Zhou R. 2010. “Profiling Sex-Specific piRNAs in Zebrafish.” *Genetics* 186(4): 1175–85.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Stades de développement du médaka utilisés dans nos études (selon Iwamatsu et al., 2004)

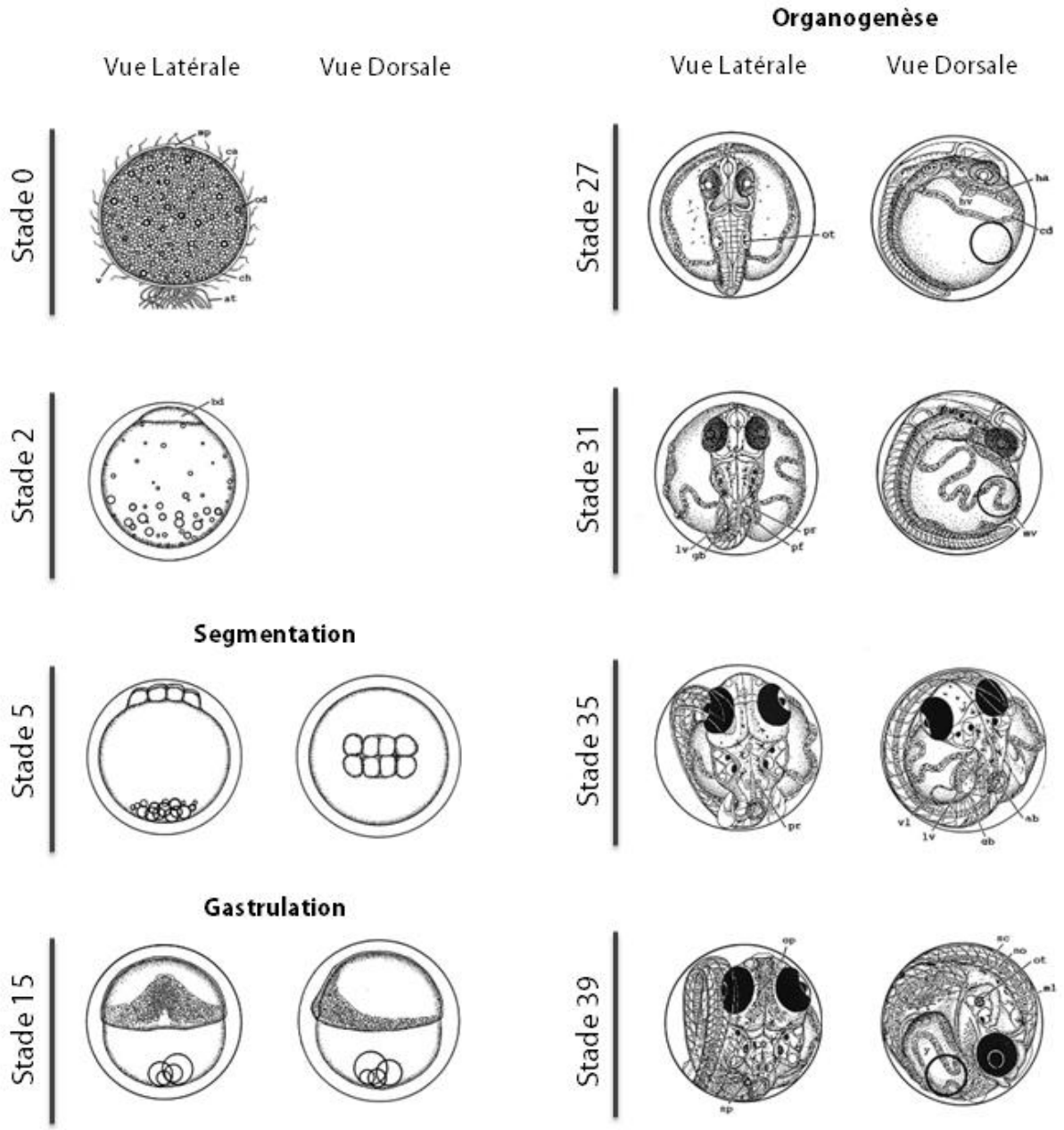
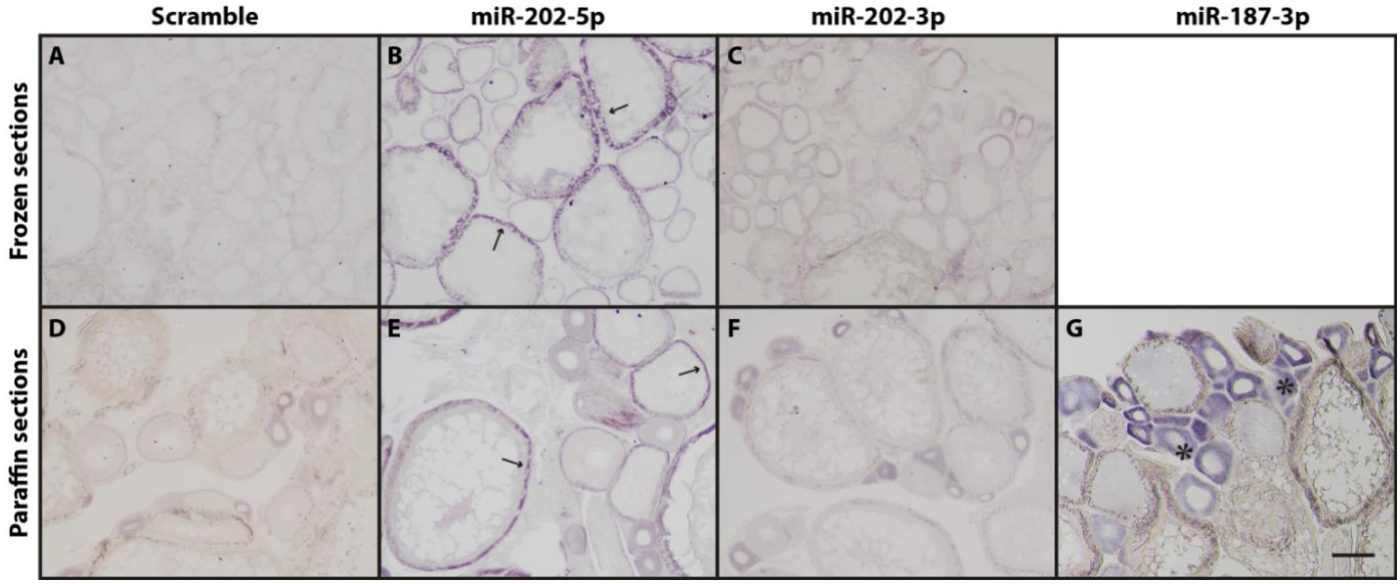


Tableau des correspondances du médaka

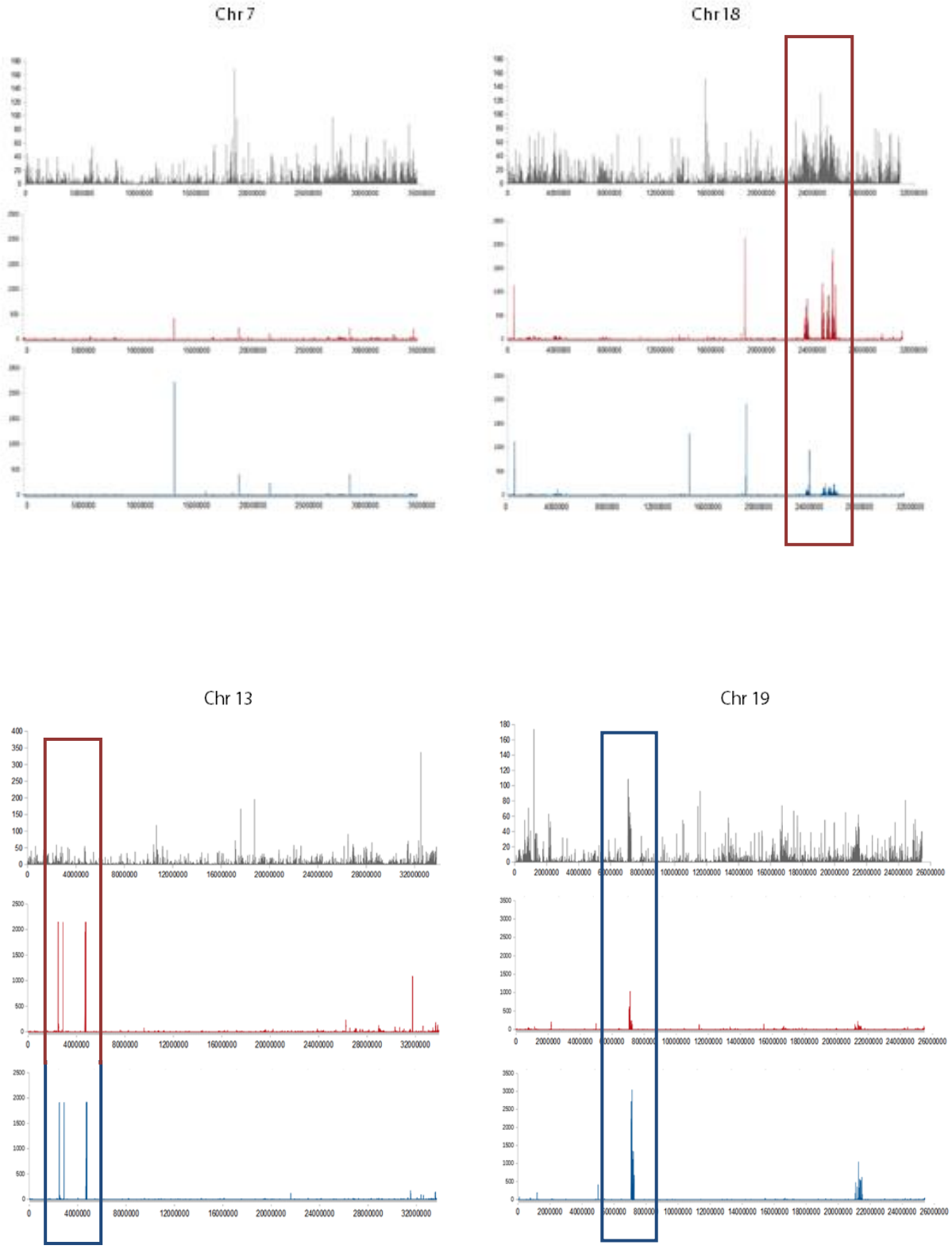
Stade0 → Non fécondé
Stade 2 → 0,5 hpf
Stade 5 → 2,3 hpf
Stade 15 → 17,5 hpf
Stade 27 → 58 hpf (2,4 jpf)
Stade 31 → 95 hpf (4 jpf)
Stade 35 → 132 hpf (5,5 jpf)
Stade 39 → 216 hpf (9 jpf)

hpf : heure post-fécondation ; jpf : jour post-fécondation

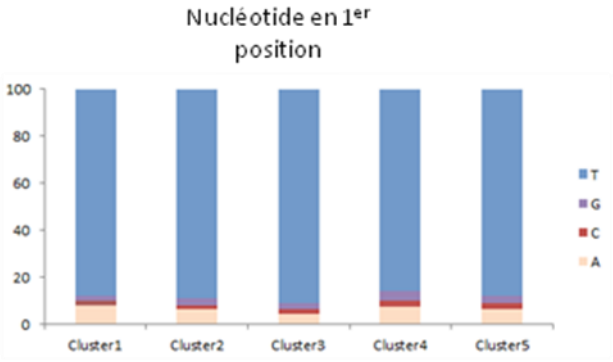
ANNEXE 2 : Localisation de miR-202-5p sur des coupes d'ovaire de femelles adultes réalisées au cryostat

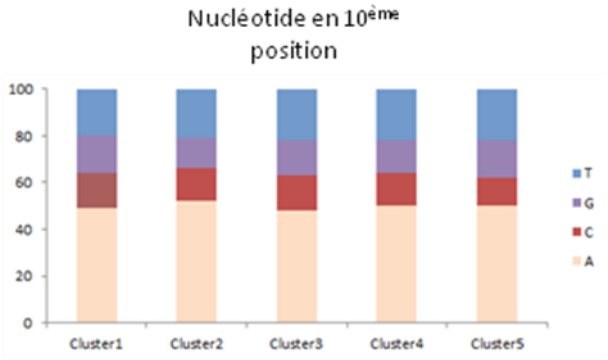


ANNEXE 3 : Densité et expression des piARNs dans les chromosomes 7, 18, 13 et 19. Exemples de clusters ovariens dans le chromosome 18 (encadré rouge), gonadiques dans le chromosome 13 (encadré rouge et bleu) et testiculaire dans le chromosome 19. Densité des piARNs (gris) et expression des piARNs dans l'ovaire (rouge) et dans le testis (bleu).

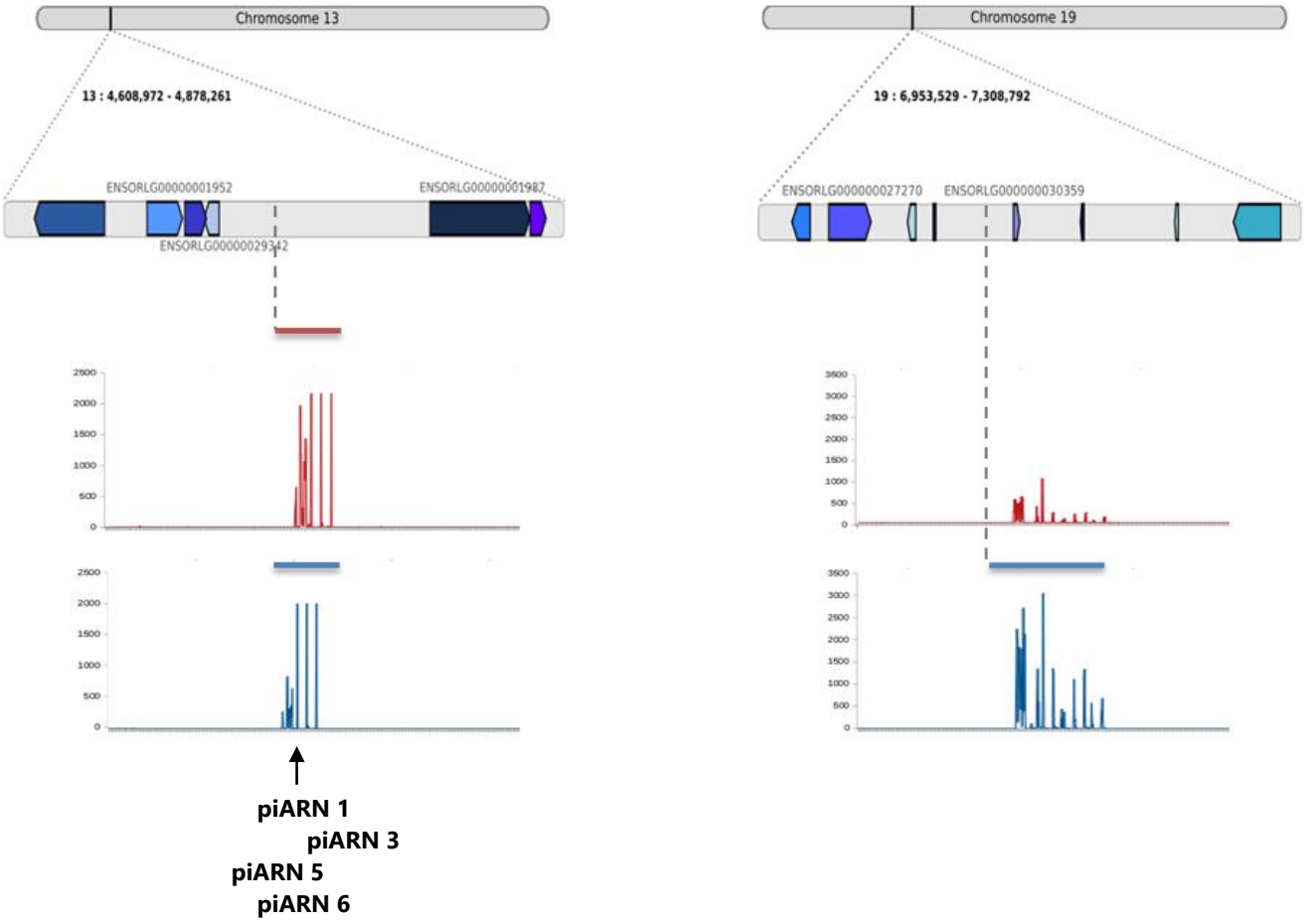


ANNEXE 4 : Analyse du 1er et 10ème nucléotide des piARNs présents dans les 5 clusters ovariens du chromosome 18.

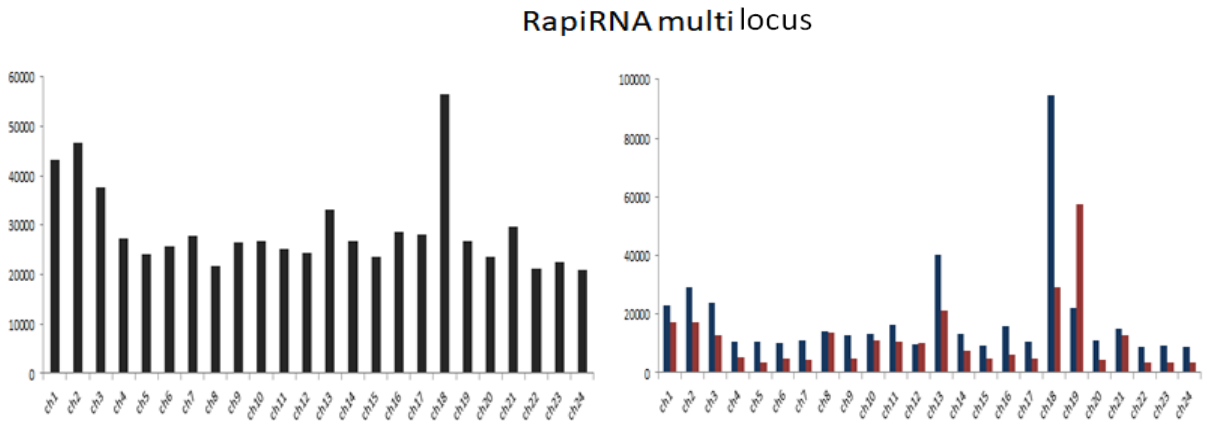


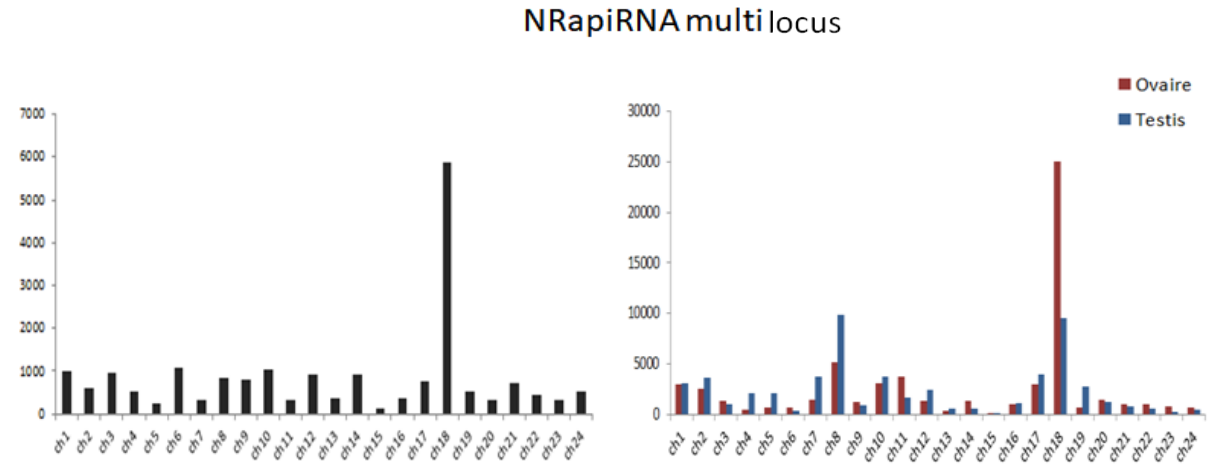


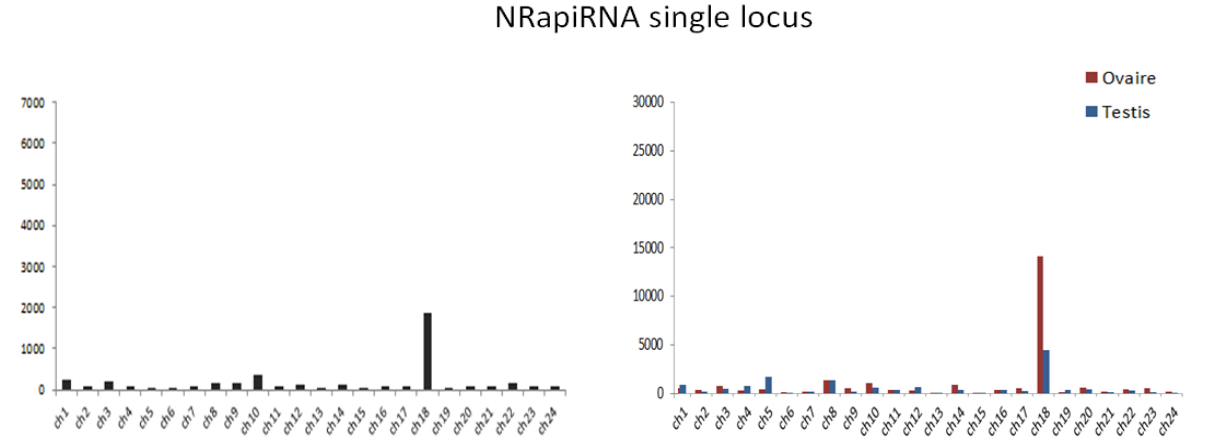
ANNEXE 5 : Localisation des clusters gonadiques et testiculaires dans les chromosomes 13 et 19. Expression des piARNs dans l'ovaire (rouge) et dans le testis (bleu).



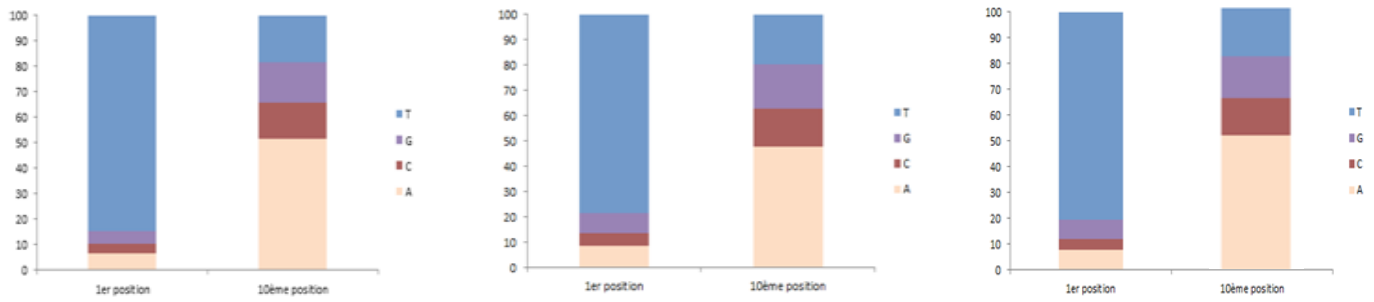
ANNEXE 6 : Distribution et expression des RapiARNs, NRapiARNs et NRapiARNs avec une localisation unique dans les chromosomes.

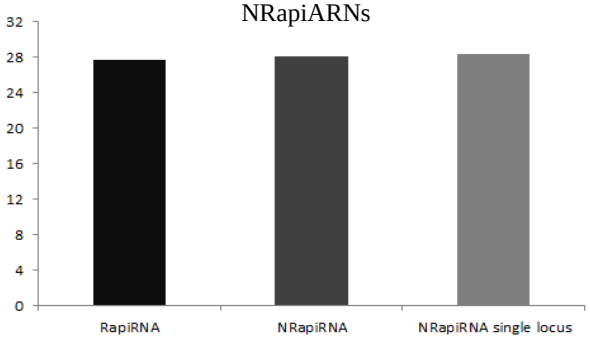






ANNEXE 7 : Analyse du 1er et 10ème nucléotide des RapiARNs, NRapiARNs et NRapiARNs avec une localisation unique, et de leur taille.





ANNEXE 8 : Tableau récapitulatif du nombre de piARNs (RapiARNs et NRapiARNs) présents chez le médaka et de leur localisation

	Nombre de séquences transcrites		Nombre de localisation dans le génome	Nombre moyen de localisation / séquence	Nombre de séquences avec une localisation unique	
piARNs	47112		718485	15,3	12406	26,3%
RapiARNs	38788	82,3%	698586	18	7910	20,4%
NRapiARNs	8324	17,7%	19899	2,4	4496	54,0%

ANNEXE 9 : Liste des 42 NRapiARN les plus exprimés sur les 1121 NRapiARN ovariens avec une localisation unique dans le génome

gene_id	Locations	ovary	testis	eyes	brain	gills	heart	muscle	liver	kidney	intestine
gl114509	18:25436025-25435997	2035	68	0	0	0	2	1	1	0	0
gl44540	18:23368744-23368771	768	16	0	0	0	0	0	0	0	0
gl41758	18:25475450-25475479	542	11	0	0	0	0	0	0	0	0
gl83139	18:25475482-25475510	395	10	1	1	0	0	0	0	0	0
gl114738	23:6262125-6262148	351	9	0	0	1	2	0	0	0	0
gl128442	8:22294013-22294036	331	263	0	0	1	0	0	0	0	0
gl71291	8:26238730-26238702	327	36	0	0	0	1	0	0	0	0
gl115172	14:12570928-12570900	309	4	3	0	0	1	0	0	0	0
gl85820	10:23236828-23236801	277	28	0	0	0	0	0	0	0	1
gl66272	17:2150644-2150619	264	5	0	1	0	0	0	0	1	0
gl115717	14:30151786-30151816	261	2	1	0	0	0	0	0	0	0
gl62217	18:25511438-25511410	238	75	0	0	0	1	1	0	0	0
gl111016	18:25020713-25020740	229	11	0	0	0	0	0	0	0	0
gl55975	17:31749757-31749780	211	16	0	0	1	0	0	0	0	0
gl84513	3:1772108-1772081	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0
gl129046	6:8632453-8632480	183	1	0	1	0	0	0	0	0	0
gl61828	8:26238059-26238035	180	22	0	0	0	0	0	0	0	0
gl89195	18:25435694-25435665	175	1	0	0	0	0	0	0	0	0
gl68384	2:10458126-10458100	175	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gl114840	23:1081915-1081944	170	16	0	0	0	0	0	0	0	0
gl22370	9:20996134-20996163	158	43	0	0	1	0	0	0	0	0
gl20292	17:12667092-12667122	154	37	0	0	0	0	0	0	0	0
gl112233	2:10456920-10456896	150	3	0	0	0	0	0	0	0	0
gl53621	18:16122370-16122342	149	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gl75352	8:7709355-7709329	143	22	0	0	0	0	0	0	0	0
gl105324	11:19249992-19250020	142	102	0	0	1	0	0	0	0	0
gl114895	18:25397692-25397720	141	9	1	0	0	0	0	0	0	0
gl25054	18:1700067-1700040	137	16	0	0	0	0	0	0	0	0
gl81296	9:20994057-20994087	132	4	0	0	0	0	1	0	0	0
gl34177	18:25398700-25398728	124	25	0	0	0	0	1	0	0	0
gl47634	18:25414547-25414519	117	11	0	0	1	0	0	0	0	0
gl86632	8:21508734-21508759	114	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gl79936	20:6429496-6429469	113	5	0	0	0	1	0	1	0	0
gl35409	18:23357563-23357587	111	11	0	1	0	0	0	0	0	0
gl7143	17:12666646-12666670	111	65	0	0	0	0	0	0	0	0
gl99409	17:12666586-12666612	109	38	0	0	0	0	0	0	0	0
gl98780	18:25475070-25475097	108	1	0	0	0	0	0	0	0	0
gl116420	18:3766093-3766064	107	8	0	0	0	0	0	0	0	0
gl49661	18:25510727-25510699	103	39	0	0	0	1	0	0	0	0
gl66972	3:35884964-35884993	101	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gl99655	23:13474125-13474152	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gl66592	18:25475103-25475130	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE PETITS ARN NON CODANTS EXPRIMES DANS L'OVAIRE ET POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS L'OVOGENESE CHEZ LE MEDAKA

GAY Stéphanie
01/12/2020

RÉSUMÉ

L'ovogenèse désigne les processus cellulaires qui ont lieu au sein de l'ovaire et qui aboutissent à la formation des gamètes femelles (œuf non fécondé) à chaque cycle de reproduction chez le poisson. La régulation de ce processus cellulaire a longtemps été étudiée d'un point de vue génétique mettant en évidence un grand nombre de gènes codants pour des protéines impliquées dans les régulations endocrines ou dans des voies de signalisations intracellulaires. La portion non-codante du génome a quant à elle été longtemps mise de côté, considérée comme secondaire par rapport à la part codante du génome. On sait désormais que les gènes « non-codants » peuvent jouer un rôle majeur dans la régulation de divers processus biologiques. Parmi ces gènes « non-codants » figurent les gènes à microARN et piARN dont les formes actives sont de courtes séquences de 18 - 32 nucléotides. Ces deux classes de petits ARN non-codants (ARNnc) sont considérées comme des régulateurs de l'expression des gènes et de la structure de la chromatine. Si ces petits ARNnc sont désormais très étudiés, leur implication dans le contrôle de l'ovogenèse reste en revanche assez peu documentée. Dans cette étude, nous avons entrepris d'étudier l'implication des miARN et des piARN au cours de l'ovogenèse chez le poisson modèle médaka (*Oryzias latipes)*.

Dans un premier temps, nous avons recherché les petits ARNnc exprimés spécifiquement ou de façons prédominantes dans l'ovaire, par une approche de séquençage haut débit (small RNAseq). Nous avons identifié 3 miARN ovariens-prédominants (miR-202, miR-187 et miR-7552b) et 42 piARN avec une expression ovarienne spécifique, non liés aux éléments transposables et à la protection du génome. Nous avons émis l'hypothèse que ces ARNnc ovariens-prédominants pouvaient être impliqués dans la régulation de l'expression des gènes ovariens et à ce titre jouer un rôle important dans l'ovogenèse.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle de l'un des candidats sus-cités, miR-202, par inactivation génique (KO CRISPR). L'expression gonadique de miR-202 est de loin la plus forte parmi les ARNnc mis en évidence et est localisée dans les cellules de la granulosa. De plus, miR-202 a déjà été mis en évidence dans les gonades de nombreuses autres espèces de vertébrés. En l'absence de miR-202, nous avons pu observer une forte baisse de la fécondité ainsi qu'un défaut de développement de l'ovaire adulte entrainant une forte baisse de la fécondité.

Pour conclure, nous avons pu fournir ici un répertoire détaillé des petits ARNnc ovariens potentiellement impliqués dans la fécondité chez le médaka et démontrer le rôle essentiel de l'un d'entre eux dans l'ovogenèse. Ces travaux contribuent à enrichir nos connaissances sur les réseaux moléculaires qui sous-tendent les capacités reproductives chez les poissons.

MOTS-CLÉS *: ARNnc, Oryzias latipes, gonade, ovaire, miR-202*