

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Institut des Sciences de la vie et de la santé

Unité de Génétique Moléculaire Animale

UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse N°

Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Biologie, Sciences et santé

présentée et soutenue par

L'Hôte David

le 16 Juin 2009

Exploitation d'un modèle de souris interspécifiques, recombinantes et congéniques pour la cartographie de QTL de la fertilité mâle et pour l'étude de la régulation génique testiculaire dans le contexte d'un génome mosaïque

Thèse dirigée par Dr. Ahmad OULMOUDEN et Dr. Catherine SERRES

JURY :

Rapporteurs

Dr. Sophie PISON-ROUSSEAU

DR2

U823 Institut Albert Bonniot, UJF Grenoble I

Pr. Christine DILLMANN

PU

UMR de Génétique Université Paris-Sud

Examineurs

Pr. Véronique BLANQUET

PU

UMR1061, Université de Limoges

Pr. Abderrahman MAFTAH

PU

UMR1061, Université de Limoges

Dr. Daniel VAIMAN

DR1

U567 Institut Cochin, Paris

*Pour toi mon amour,
quatre milliard d'années d'évolution
n'auront pas été vaines pour te donner naissance.*

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord le Dr Sophie Pison-Rousseaux et le Pr Christine Dillmann d'avoir accepté de rapporter ma thèse, ainsi que le Pr. Véronique Blanquet et le Pr. Abdou Maftah respectivement examinatrice et président du jury, merci de l'intérêt que vous avez porté à mes travaux,.

Je ne pourrai remercier suffisamment Catherine Serres. Merci de m'avoir supporté, écouté, conseillé et encadré : votre pondération (face à mes nombreuses loufoqueries), votre intérêt permanent et votre extrême gentillesse ont été véritablement les moteurs de mon doctorat. Merci aussi d'avoir trouvé les ressources pour me permettre de continuer une demi-année de plus. Je souhaite à d'autres la chance que j'ai eu d'être encadré par vous ! Je remercie Daniel Vaiman, de m'avoir proposé cette thèse, et de m'avoir permis de jouir d'une grande autonomie. Je remercie, de même, Ahmad Oulmouden, d'avoir accepté d'encadrer mes travaux. Sans vos concours, et celui de Raymond Julien, rien n'aurait été possible.

Mon environnement de travail n'aurait pas été le même sans Jana et Corinne. Merci à Jana de m'avoir initié aux mystères du Western Blot et de la Bi-Di. Mais aussi d'avoir été ce léger souvenir du grand Est, souvent tu m'as donné une douce nostalgie de mon enfance. Merci aussi à Corinne, de m'avoir initié à l'histologie (entre autre). Merci pour ton extravagance, et ton côté tellement décalé, un vrai ouragan dans un monde engoncé ! Un clin d'œil amusé au trogocyteurs, et particulièrement à Ahmed, décapiteur de spermatozoïdes.

Une pensée affectueuse pour le Pr. Reiner Veitia et ses groupies (les MCUEs). Merci de m'avoir permis de te chambrer sans cesse, et d'avoir supporté mes facéties. Merci aussi, de me permettre de travailler avec toi, promis, je serai respectueux (ce n'est pas gagné)! Merci à Hélène, et à Claire, vos présences calmes et amicales m'ont manqué depuis votre départ.

Je remercie le panthéon improbable de l'équipe 21 : Capucine, ma « harpie-hippie », Régis, TMM, Annick et Michèle : vous avez su mettre de l'ambiance !

Pour les « Laras », une pensée complexe, et amicale. Par ordre de toxicité décroissante : à toi Lara, merci pour ces grands moments de délire, et d'avoir défini aussi pleinement mes limites ! A Céline, collectionneuse de nains bruleurs de poubelle, et à Sandrine : merci de votre inconvenance ! Une pensée affectueuse pour mes co-galériens, passés et présents : Sonia, amicale et attentive, Bérénice, dynamique et enjouée, Aurélie, toujours prête à rendre service, mais aussi Franck et François, à l'éternelle gentillesse. Vous connaître a été pour moi un grand plaisir. Sans oublier Géraldine, Virginie et Bruno, nos doctorants-médecins, et les petits nouveaux : Magalie, Guillaume, Ludivine et Adrien. Merci à Magalie, tout particulièrement, d'avoir pris soin de mes souris pendant que je rédigeais. Mes remerciements montent vers Aminata, « Catherine-like » des étages supérieurs, ainsi que vers Louisa, Marie-Anne et Patrick. Sans oublier Anne, Batiste et Maud : que les PCEM1 se souviennent de nous à tout jamais. Il va s'en dire que j'ai une pensée spéciale pour Pierre, dont la gentillesse à mon égard m'a touché profondément.

Merci aussi à Xavier pour ces conversations très enrichissantes sur la génétique de la souris, et à Isabelle, d'avoir produit les animaux nécessaires à mes études, de m'avoir aménagé un peu de place sur ses portoirs alors que mes facilités d'animalerie se réduisaient. Je remercie aussi Emilie, Matthieu et Isabelle, de m'avoir aidé, avec un professionnalisme remarquable et une bonne humeur souvent à toute épreuve, à traverser les apocalypses murines de ces quatre dernières années.

A mes relecteurs, et tueurs de fautes d'orthographe : Vous avez toute ma compassion.

Pour finir, mes remerciements les plus affectueux vont à ma famille, à mes parents, coupables de m'avoir fait, à ma sœur et à mes frères, vous n'êtes pas étrangers à mon grain de folie, à Maryvonne et Dominique, et leurs enfants, de m'avoir accepté comme l'un des leurs. Et au delà de tous remerciements, à toi, mon amour, pour la personne que tu es, pour les sentiments que tu éveillés en moi, pour ces cinq dernières années de bonheur.

Plan du manuscrit

<i>Remerciements</i>	3
<i>Plan du manuscrit</i>	5
<i>Abréviations</i>	6
<i>Préambule</i>	7
I. Introduction	9
A. La fertilité mâle chez la souris	10
1. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle	10
2. Organisation, fonction et régulation testiculaire	14
3. Le spermatozoïde, gamète fécondant	41
B. La cartographie de QTL	48
1. Notions de génétique quantitative	48
2. Les modèles murins classiques de détections de QTL	53
3. Le modèle IRCS	63
4. Application de la cartographie des QTL à la fertilité, un caractère complexe	67
C. Présentation du travail de thèse	75
II. Résultats	77
A. Recherche de QTL de fertilité mâle	78
1. Primo-localisation de QTL impliqués dans la modulation de paramètres de la fertilité mâle dans le modèle murin IRCS	78
2. Cartographie fine des QTL de poids testiculaire et de morphologie des spermatozoïdes	85
B. Etude du transcriptome testiculaire dans le contexte du mosaïcisme interspécifique ...	117
1. Introduction et résumé de l'article	117
2. Discussion et Conclusion de l'article 2	125
3. Article 2	129
III. Conclusion générale et perspectives	130
IV. Références	136
V. Annexe	149

Abréviations

AIL: Advanced Intercross Line

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ARN: Acide RiboNucléique

AR: Androgen Receptor

AMH: Hormone Anii Müllérienne

B6: C57Bl6/J

Chr: Chromosome (MMU en nomenclature internationale)

E.: Age de l'embryon en jour *post coitum*

FSH: Hormone folliculo-stimulante

IRCS: Interspecific Recombinant Congenic Strain

JPP: Age de l'individu en jour *post partum*

LH: Hormone Lutéinisante

PGC: Primordial Germ Cell

QTL: Quantitative Trait Locus (locus contrôlant un phénotype quantitatif)

QTN: Quantitative Trait Nucleotid

RA: Réaction Acrosomique

RE: Réticulum Endoplasmique

RIS: Recombinant Inbred Strain

RCS: Recombinant Congenic Strain

SDP: Strain Distribution Pattern

SE: Spécialisation Ectoplasmique

T: Testostérone

TP: Thèque Périnucléaire

UTR: UnTranslated Region

Préambule

D'après un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, l'infertilité humaine, définie comme l'incapacité pour un couple à concevoir un enfant après dix huit mois de rapports non protégés, affecte environ 15% des couples dans le monde. On estime que, dans approximativement 20% des cas, l'infertilité du couple est d'origine masculine uniquement [17]. Une baisse de la fertilité associée à une dégradation des paramètres spermatiques chez l'homme a été suggérée dans plusieurs études [18]. Une baisse similaire de la fertilité a été observée chez les animaux domestiques d'élevage [19]. Deux causes sont principalement avancées pour expliquer cette détérioration de la fertilité mâle : l'impact de facteurs environnementaux comme les perturbateurs endocriniens [20] et les causes génétiques. Concernant la régulation génique de la fertilité, un nombre croissant de gènes sont régulièrement impliqués dans l'infertilité, et actuellement, plus de trois cents modèles de souris invalidés pour un gène montrent des défauts de fertilité [21-23]. Un nombre croissant d'études transcriptomiques [24, 25], et protéomiques [26, 27] propose de nouveaux gènes candidats sur des critères d'expression tissulaire gonadique, ou de présence des protéines dans les gamètes. Enfin, des études de génétique quantitative proposent régulièrement de nouvelles régions chromosomiques impliquées dans la régulation de la fertilité mâle (pour une revue exhaustive, voir chapitre I.B.4 du présent document).

Toutefois, les retombées en clinique humaine de ces recherches sur l'animal sont pauvres : en effet, le diagnostic génétique de l'infertilité masculine consiste essentiellement en la recherche de trois grandes causes : Les anomalies chromosomiques (associées à des oligospermies ou des azoospermies), les mutations du gène CFTR (associées à une agénésie des canaux déférents) et les micro-délétions du chromosome Y (associées à des défauts isolés de la spermatogenèse)[28].

En débutant ce travail, nous avons comme objectif d'identifier de nouveaux gènes contrôlant subtilement la fertilité mâle et pouvant être responsable d'hypofertilité chez l'homme. Afin de découvrir de nouveaux acteurs génétiques régulant cette fertilité mâle, nous avons analysé un ensemble de paramètres phénotypiques, classiques et originaux, caractérisant l'ensemble des glandes de l'appareil reproducteur mâle sur des souris appartenant à un modèle original.

En introduction de ce mémoire, je décrirai ces organes, et succinctement leurs fonctions. Parmi les paramètres de fertilité, je me suis plus particulièrement intéressé au testicule, et aux spermatozoïdes qu'il produit, sur lesquels j'ai conduit une analyse morphologique et fonctionnelle. Je détaillerai donc le fonctionnement et la régulation du testicule ainsi que le processus de morphogenèse de la tête des gamètes mâles lors de la spermiogenèse. Dans une seconde partie, je décrirai les différents outils génétiques qui permettent de cartographier des régions chromosomiques impliquées dans la régulation des phénotypes à déterminisme complexe et je présenterai le modèle de souris que j'ai utilisé au cours de mes travaux de thèse.

Ensuite, j'exposerai mes travaux, et les principaux résultats que j'ai pu obtenir.

I. Introduction

A. La fertilité mâle chez la souris

I. Anatomie de l'appareil reproducteur mâle

L'appareil reproducteur mâle se compose des testicules, des conduits excréteurs (*Rete testis*, canaux efférents, épидидymes, canaux déférents, et urètre), et des glandes annexes (vésicules séminales, prostate, glandes bulbo-urétrales et préputiales) (Figure 1).

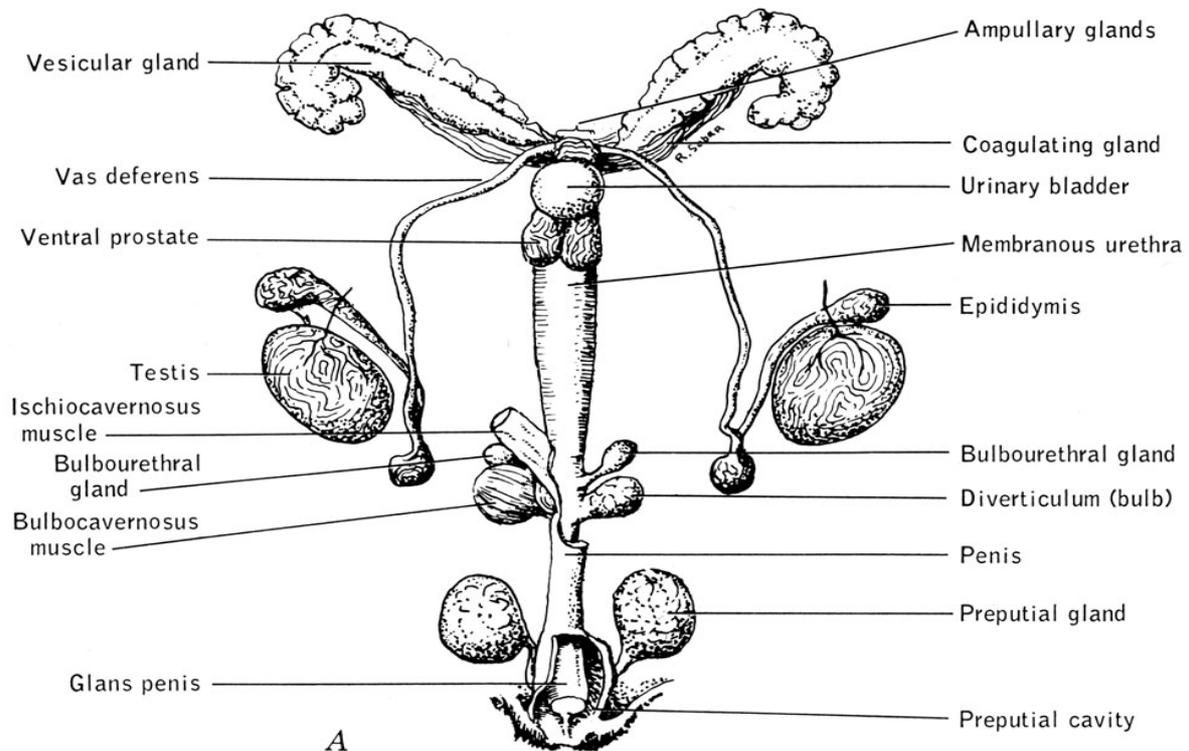


Figure 1 Dessin de l'appareil reproducteur mâle de la souris adulte

L'appareil reproducteur mâle des mammifères se compose d'un ensemble de glandes excrétrices : testicules, vésicules séminales, prostate, glandes bulbo-urétrales et préputiales, participant à la production du sperme, et de conduits excréteurs : canaux efférents, épидидymaires, et déférents, ainsi que l'urètre.

Extrait de "*Biology of the Laboratory Mouse*"

www.informatics.jax.org/greenbook/index.shtml [6]

a) Les testicules

Les testicules sont des glandes à fonction exocrine (production des spermatozoïdes) et endocrine (production des androgènes : testostérone, dihydrotestosterone, androstènedione...) de forme ovale, localisées dans le scrotum, de part et d'autre du pénis. Les testicules sont formés d'un enchevêtrement de tubes séminifères, entouré d'une capsule conjonctive : l'albuginée. Les tubes séminifères sont le siège de la spermatogenèse ; entre les tubes se trouve le tissu interstitiel endocrinien et la vascularisation testiculaire. L'organisation et la fonction du testicule seront décrites plus précisément au chapitre A.1.b.

b) Les canaux excréteurs

Dans le testicule, les tubes séminifères se rejoignent pour former un labyrinthe lacunaire, appelé *rete testis*. De celui-ci émergent 5 canaux efférents qui se fondent en un unique canal : le canal épидидymaire. L'épididyme est formé de cet unique canal replié sur lui-même et empaqueté dans une tunique conjonctive. Il comporte trois parties identifiables sous la loupe : la tête (*caput*), le corps (*corpus*) et la queue (*cauda*). Les fonctions de l'épididyme sont multiples :

- réabsorption du fluide testiculaire émanant de l'excrétion des cellules de Sertoli.
- maturation fonctionnelle des gamètes (acquisition de la mobilité progressive, modification de la composition membranaire des gamètes...).
- stockage et conditionnement des spermatozoïdes.
- réabsorption des déchets, comme la gouttelette cytoplasmique (reste cytoplasmique perdu par le spermatozoïde dans l'épididyme) ou les cellules en dégénérescence [29].

- l'épididyme, par ses sécrétions, participe de façon minoritaire au plasma séminal.

Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme sont activement excrétés dans le canal déférent. Les glandes annexes qui s'abouchent à la base des canaux déférents (vésicules séminales), et dans l'urètre (prostate et glandes bulbo-urétrales) sécrètent alors le plasma séminal.

c) Les glandes annexes

La fonction première des glandes annexes principales (vésicules séminales et prostate) est de produire le liquide séminal accompagnant les spermatozoïdes lors de l'éjaculation.

Les vésicules séminales sont deux glandes exocrines s'abouchant sur les canaux déférents. La sécrétion des vésicules séminales représente environ 60 à 70% du volume de l'éjaculat. Cette sécrétion a plusieurs fonctions :

- la coagulation du sperme.

- la formation du bouchon vaginal chez la souris (Cette structure est spécifique des rongeurs, l'absence de sa formation conduit à une infertilité mâle [30]). Chez l'homme, l'acteur principal de cette coagulation est la protéine Semenogelin I. Cette protéine n'est pas retrouvée chez les rongeurs, mais il existe des analogues fonctionnels : les *Svs* (*Seminal vesicle secretion*), sept gènes sont actuellement décrits chez la souris.

- la régulation de la mobilité des gamètes (production de fructose, de protéines agissant sur la mobilité de façon inhibitrice [31] [32] ou activatrice [33]).

- la protection des gamètes contre l'effet des dérivés réactifs de l'oxygène, par une action anti-oxydante de la vitamine C contenue dans les sécrétions [34].

La prostate, entourant l'urètre de ses parties latérales et ventrales, produit environ 20% du plasma séminal. La fraction prostatique interviendrait dans la liquéfaction du coagulum et la restauration de la mobilité des spermatozoïdes, notamment grâce à l'action protéolytique du *Prostate specific antigen* (PSA) qui lève l'inhibition par la Semenogelin 1 (ou de *svs2* chez la souris [35]) [36, 37] et grâce à un effet du Zinc, présent en forte concentration [32].

Les glandes bulbo-urétrales, nommées aussi glandes de Cooper, ont pour fonction de sécréter un fluide lubrifiant précédant l'éjaculat, neutralisant les traces d'acide urique présentes dans le tractus urogénital [38].

Enfin, les glandes préputiales, très développées chez les rongeurs, joueraient un rôle dans la régulation des comportements reproducteurs, par émission de phéromones dans les urines (territorialité et agressivité des mâles, reconnaissance de sous-espèces...)[39].

L'ensemble de ces glandes annexes est soumis à une régulation androgénique. Le taux de testostérone circulant régule leur développement à la puberté, ainsi que leur fonctionnement à l'âge adulte. Chez la souris, l'invalidation du gène du récepteur aux androgènes *Ar*, de façon restreinte, dans la prostate, les vésicules séminales et l'épididyme, conduit à une réduction significative du poids de ces glandes, à des anomalies histologiques de leur épithélium sécrétoire ainsi qu'à la diminution de leur capacité sécrétoire [40]. Les glandes annexes constituent donc des marqueurs de la bonne imprégnation hormonale.

2. Organisation, fonction et régulation testiculaire

a) Histologie du testicule adulte

Le testicule est sectorisé en deux grands compartiments : les tubes séminifères, où prend place la spermatogenèse (fonction exocrine) et l'espace interstitiel, dans lequel on retrouve notamment les cellules de Leydig à fonction endocrine, organisées en îlots à proximité de capillaires sanguins (Figure 2). Les tubes séminifères sont entourés de cellules péritubulaires dites myoïdes. Elles possèdent des propriétés contractiles aidant au transport des spermatozoïdes et du fluide testiculaire vers le *rete testis* [41].

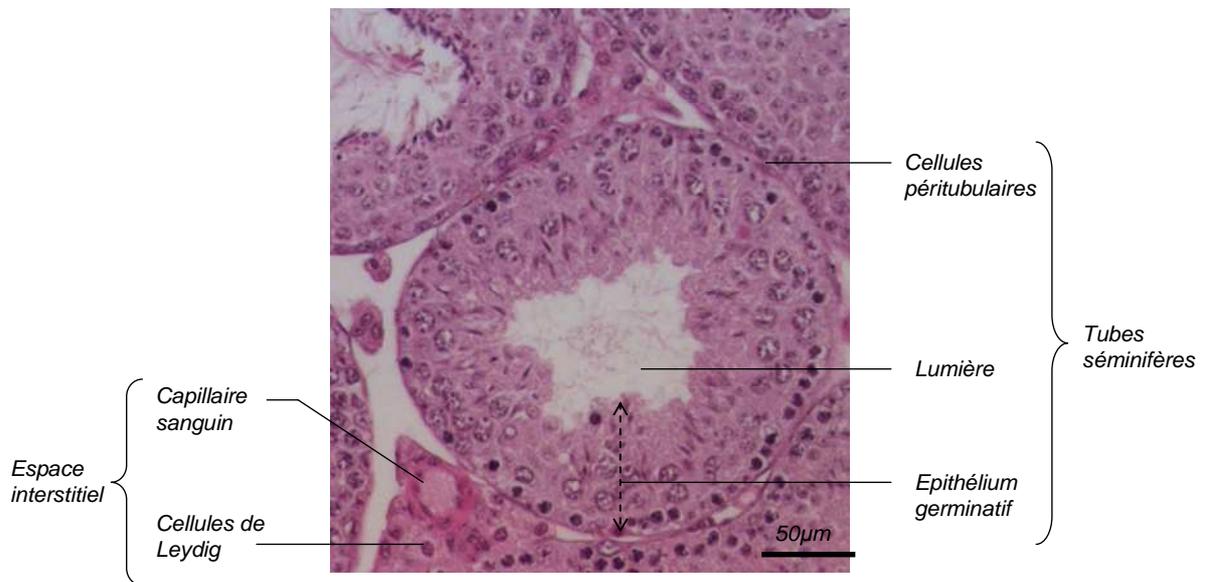


Figure 2 Détail d'un tube séminifère de testicule de souris adulte en coupe transversale après coloration HES (X20).

Le testicule se constitue d'un enchevêtrement organisé de tubes séminifères séparés par un tissu interstitiel dans lequel résident les cellules de Leydig, assurant la fonction stéroïdogenique. Un tube séminifère, ici en coupe transversale, présente un épithélium germinatif composé de cellules somatiques, les cellules de Sertoli, soutenant des cellules germinales. Le tube séminifère est entouré de cellules épithéliales péritubulaires à propriété contractile, les cellules myoïdes.

L'épithélium germinatif est composé de cellules de Sertoli, cellules somatiques, qui soutiennent la spermatogenèse (Figure 3).

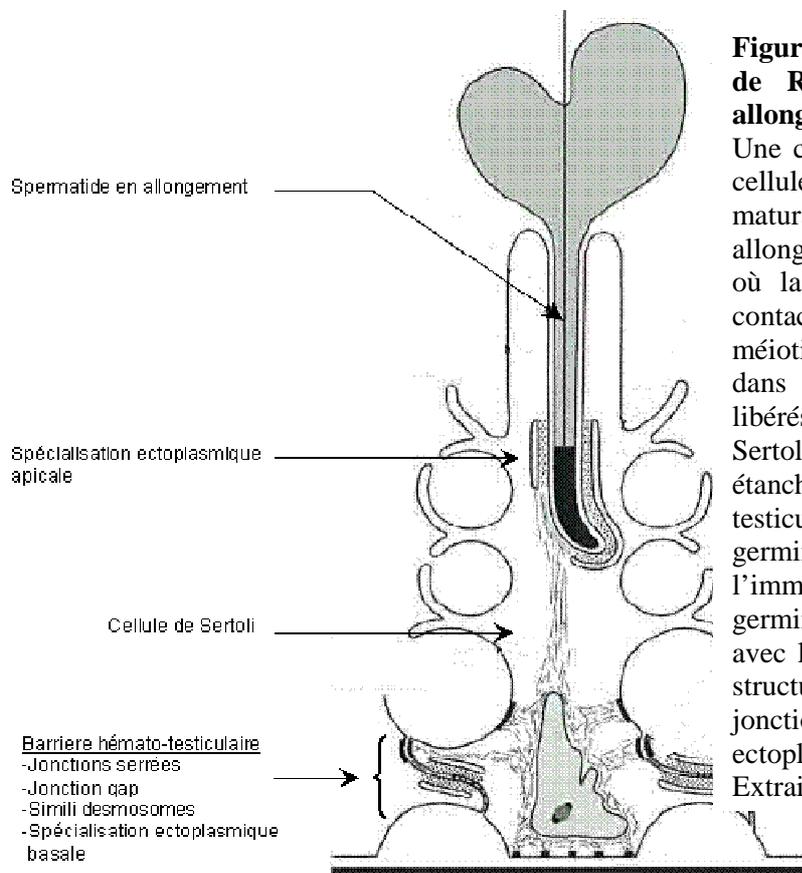


Figure 3 Dessin d'une cellule de Sertoli de Rat, soutenant une spermatide allongée.

Une cellule de Sertoli soutient plusieurs cellules germinales à des stades de maturation différents. Son cytoplasme allongé s'étend de la lame basale du tube, où la membrane de la cellule est en contact avec les populations pré-méiotiques, jusqu'à la lumière du tube, dans laquelle les spermatozoïdes sont libérés. À leur base, les cellules de Sertoli établissent entre elles des contacts étanches formant la barrière hémato-testiculaire. Celle-ci protège les cellules germinales post-méiotiques de l'immunité somatique. Les cellules germinales sont maintenues en contact avec la cellule de Sertoli par différentes structures cytosquelettiques et jonctionnelles, dont la spécialisation ectoplasmique apicale.

Extrait et modifié de : Vogl *et al.* 2000

Chaque cellule de Sertoli est en contact avec une demi-dizaine d'autres cellules de Sertoli, avec lesquelles elle établit des jonctions imperméables, constituant la barrière hémato-testiculaire. De forme pyramidale, elle constitue une véritable ossature pour les cellules germinales en différenciation. Situées au delà de la barrière hémato-testiculaire, dans le compartiment *ad luminal*, les cellules germinales entrées en spermatogenèse, sont isolées et protégées du système immunitaire somatique (les spermatides présentent de nombreux antigènes cryptiques). Une cellule de Sertoli soutient environ 30 à 50 cellules germinales à différents stades de différenciation [42]. La cellule de Sertoli a aussi des fonctions de phagocytose (des corps résiduels, des cellules en dégénérescence, et des complexes jonctionnels) et de sécrétion (nutrition des cellules germinales, facteurs de différenciation et de croissance, production du fluide testiculaire).

b) Organogenèse du testicule

i La gonade indifférenciée

Le testicule est issu de la différenciation de la gonade primitive. Cette gonade indifférenciée se forme pendant la vie fœtale (E9.5 à E10¹ chez la souris) à partir de la crête génitale, un épaissement de l'épithélium cœlomique qui borde le mésoderme intermédiaire. Cet épaissement forme le *cortex* de la gonade primitive. Les cellules de l'épithélium cœlomique prolifèrent et pénètrent dans le mésoderme sous-jacent, formant les cordons primitifs de la *medulla*. (Figure 4). Parmi ces cellules se trouvent les précurseurs des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig en partie [43, 44].

Chez la souris, plusieurs gènes sont connus pour être impliqués dans la survie et la prolifération des cellules de la gonade primordiale (Figure 4). Leur invalidation conduit invariablement à la régression de la gonade primordiale dans les deux sexes [1-4].

Les cellules germinales ne se différencient pas au même endroit que les cellules somatiques de la gonade. D'origine épiblastique, elles sont détectées à partir d'E7-E7.2, à la base du sac vitellin, dans les tissus extra-embryonnaires. [45, 46]. A ce stade de différenciation, on les nomme PGC (pour cellules germinales primordiales). Entre E10 et E11.5, les PGC vont migrer de l'allantoïde vers la gonade primitive et la coloniser. Chez la souris, différentes mutations sont connues pour interférer avec la migration et la survie des PGC, provoquant l'infertilité sans altérer la différenciation sexuelle (Figure 4) [47].

¹ E : Age de l'embryon exprimé en jour depuis l'accouplement fécondant.

A ce stade de développement, la gonade n'est toujours pas morphologiquement différenciée.

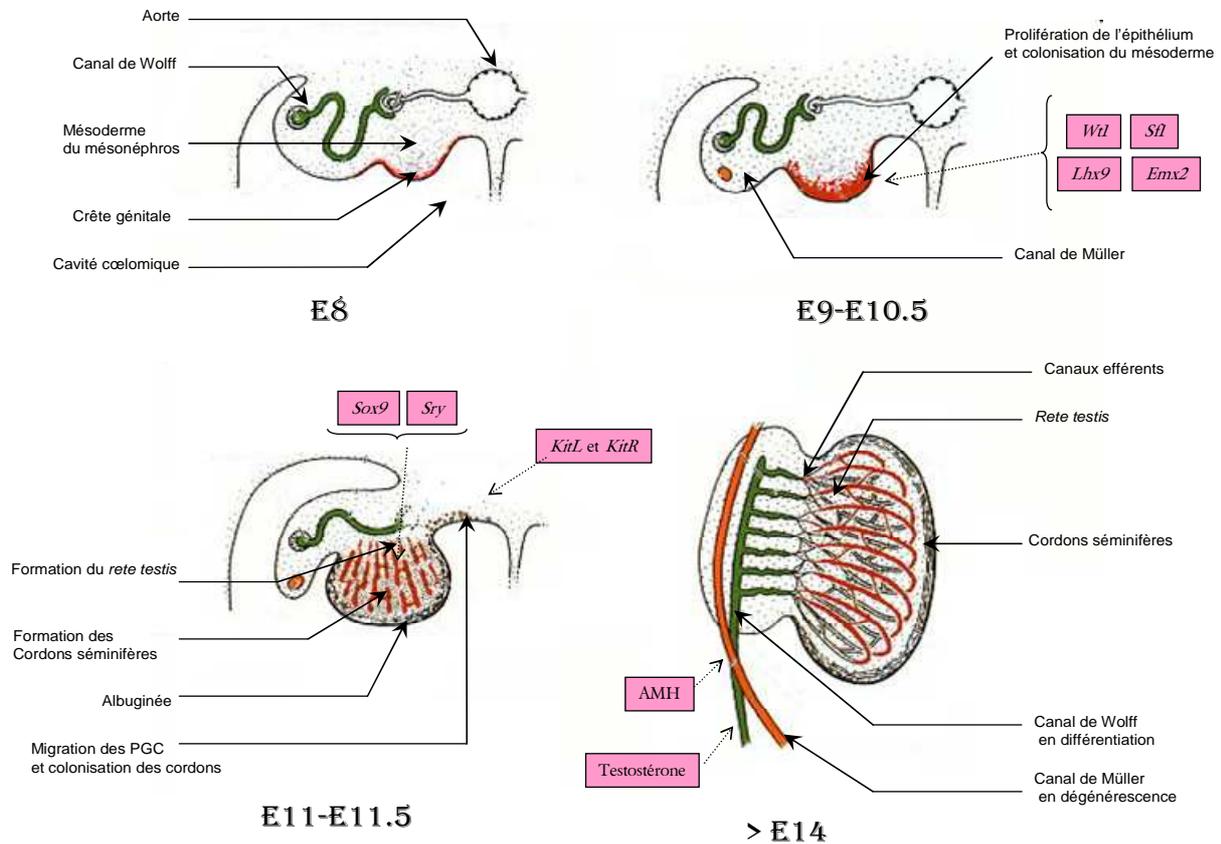


Figure 4 La morphogenèse du testicule de la souris, de la gonade primordiale au testicule embryonnaire.

La gonade indifférenciée se forme par un épaississement de l'épithélium coelomique au niveau du mésonephros, qui prolifère et l'envahit (E8 à E10.5). Des mutations invalidant les gènes Steroidogenic factor 1 (*Sf1*) [1], Lim-like homeodomain protein (*Lhx9*) [2], paired-like homeobox gene (*Emx2*) [3], et Wilms tumor 1 (*Wt1*) [4] conduisent à la régression de la gonade primordiale dans les deux sexes.

Les cellules germinales migrent depuis l'allantoïde et colonisent le mésonephros pour former les cordons séminifères (E11 à E11.5). Des facteurs ont été impliqués dans cette migration : par exemple, les mutations du ligand KITL et de son récepteur KITR sont connues pour bloquer la migration des PGC.

À partir d'E14, le canal de Wolff, sous l'action de la testostérone, se différencie pour donner les canaux excréteurs, alors que le canal de Müller dégénère sous l'action de l'AMH.

Extrait et modifié de : *Developmental Biology, 6th Edition* [10]

ii La différenciation testiculaire

D'un point de vue moléculaire, la différenciation sexuelle commence à E11, quand le gène majeur de la détermination testiculaire, *Sry*, est exprimé dans les précurseurs des cellules de Sertoli [48]. L'action moléculaire de *Sry* n'est pas entièrement élucidée. La morphogénèse testiculaire commence rapidement après l'expression de *Sry*. Alors que les précurseurs des cellules de Sertoli entourent les PGC, une vague de migration de cellules myoïdes originaires du mésonéphros, permet l'épithélialisation des cordons séminifères en formation [49] (Figure 5). Une fois les cordons mis en place, les cellules de Leydig commencent à exprimer les gènes impliqués dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes mâles et à sécréter de la testostérone. Le rôle endocrinien des cellules de Leydig nécessite une vascularisation: A E12.5, un nouveau système artériel apparaît dans le testicule en développement (Figure 5) [50].

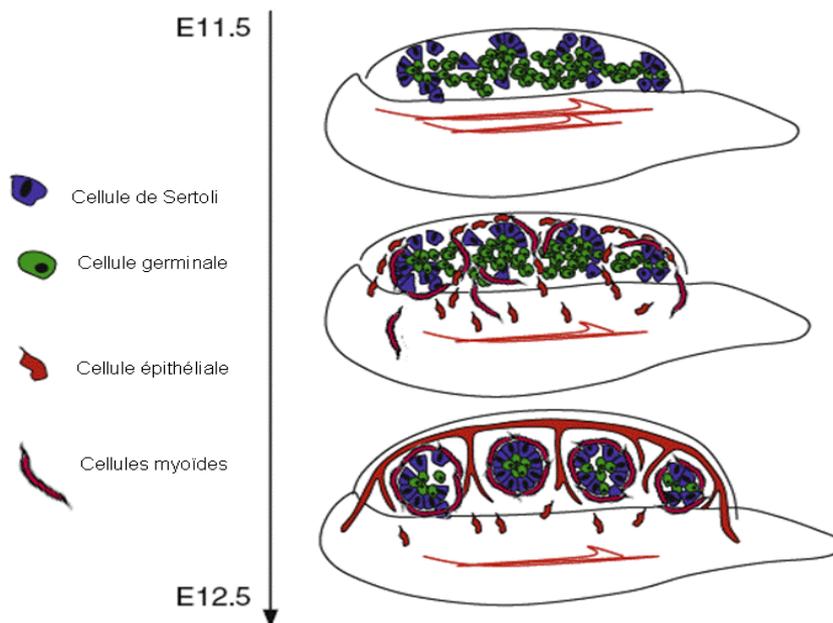


Figure 5 Formation des cordons séminifères et vascularisation du testicule embryonnaire

Vers E11.5, les cellules de Sertoli immatures entourent les cellules germinales alors que des cellules myoïdes en provenance du mésonéphros épithélialisent les cordons en formation.

En parallèle de la formation des cordons séminifères, des cellules épithéliales migrent vers la gonade en développement pour former la vascularisation testiculaire.

Adapté de Maatouk, D. M. et Capel, B. 2008 [8]

iii Masculinisation du tractus génital

La masculinisation du tractus génital de l'embryon XY provient de deux hormones : la testostérone (ou dérivés) sécrétée par les cellules de Leydig fœtales et l'hormone anti-müllérienne (AMH) sécrétée par les cellules de Sertoli. A proximité de la gonade en développement, se trouvent deux canaux, le canal de Wolff (précurseur des canaux excréteurs mâle), et le canal de Müller (qui se différenciera en oviducte, utérus et une partie du vagin dans l'embryon femelle) (Figure 4). L'AMH induit la dégénérescence du canal de Müller, alors que la testostérone induit la différenciation du canal de Wolff pour former l'épididyme, les vésicules séminales et les canaux déférents. La masculinisation du tractus génital mâle (l'urètre, et la prostate) et l'organogenèse du pénis et du scrotum, sont sous le contrôle de la 5 α -dihydrotestostérone (dérivé de la testostérone par l'action de la 5 α -réductase) [51].

iv Evénements post-nataux et pré-pubertaires

Les cellules de Sertoli, qui n'ont pas encore acquis leur morphologie adulte, vont proliférer jusqu'à 10-12 jours *post-partum* (JPP). A ce stade, elles représentent 80% de la population cellulaire testiculaire. [52]. Après une phase proliférative, les PCG ou gonocytes vont cesser toutes mitoses vers E14, et vont commencer une différenciation en précurseurs de spermatogonies [53].

Un jour et demi après la naissance, les gonocytes reprennent leur prolifération et migrent vers la périphérie du cordon séminifère [54]. A 5 JPP, les gonocytes commencent leur différenciation en spermatogonies de type A. Les spermatogonies qui n'atteignent pas la lame basale du tube meurent par apoptose [55]. Au moment de la puberté, les cellules de Sertoli acquièrent leur morphologie définitive et perdent leur aptitude mitotique [56]. Le ratio entre

cellules germinales et cellules de Sertoli s'établit au moment de l'arrêt mitotique des cellules de Sertoli [57], lors du début de la première vague de la spermatogenèse. L'établissement de ce ratio s'effectue par une apoptose massive des cellules germinales (pour revue [58]). Chez la souris, la méiose commence vers 7 JPP.

c) Organisation de la Fonction exocrine

i Contrôle de la fonction exocrine

La fonction de production des spermatozoïdes est régulée par des interactions complexes faisant intervenir de nombreux acteurs endocrines, paracrines et juxtacrines. Cette régulation s'intègre dans un dialogue entre l'axe hypothalamo-hypophysaire et la gonade. L'axe hypothalamo-hypophysaire régule les fonctions testiculaires via deux gonadotrophines pituitaires, la *follicle stimulating hormone* (FSH) et la *luteinizing hormone* (LH). Sous l'action de la LH, les cellules de Leydig produisent de la testostérone. Ces trois hormones sont essentielles au bon déroulement de la spermatogenèse. A la puberté, sous contrôle de la GnRH (*gonadotrophin releasing hormone*) hypothalamique, la LH et la FSH sont secrétées, conduisant à une augmentation du taux de testostérone circulant, qui se traduit par une virilisation de l'organisme (acquisition des caractères sexuels secondaires) et par l'amorçage de la spermatogenèse. La testostérone agit en retour sur l'axe hypothalamo-hypophysaire pour inhiber la synthèse de GnRH et des gonadotrophines [59]. Sous contrôle de la FSH, les cellules de Sertoli produisent une hormone peptidique, l'inhibine B, qui inhibe en retour la synthèse de la FSH par l'hypophyse [59, 60]. Une autre hormone peptidique, l'Activine A, est

en partie produite par les cellules de Sertoli, cependant, le rôle de l'activine A dans la régulation testiculaire est peu probable [61].

Le contrôle de la fonction testiculaire par la glande pituitaire se fait à deux niveaux principalement : au niveau des cellules de Leydig et au niveau des cellules de Sertoli.

- Contrôle des cellules de Leydig : la cellule de Leydig adulte porte à sa surface des récepteurs transmembranaires à la LH (LHR). La LH contrôle la production et l'excrétion de la testostérone des cellules de Leydig adultes par de la modulation des gènes de la voie de synthèse des androgènes, comme par exemple StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*), HSD (*17beta-HydroxySteroid Dehydrogenase*) 17alpha-hydroxylase cytochrome P 450...Le modèle LuRKO d'inactivation du récepteur LHR présentant un hypogonadisme, sous-exprime ces gènes [62]. Chez la souris, les androgènes ainsi que la FSH semblent jouer un rôle important dans la maintenance de la fonction des cellules de Leydig [63]. En effet, plusieurs travaux ont montré que les cellules de Leydig répondaient *in vivo* à la FSH [64] alors que celles-ci n'expriment pas de récepteur à la FSH (FSHR). Comme seules les cellules de Sertoli possèdent des récepteurs FSHR, une régulation endogène, via les cellules de Sertoli est envisageable.

- Contrôle des cellules de Sertoli : la FSH et la testostérone (T) sont des hormones essentielles au bon déroulement de la spermatogenèse. L'inactivation du récepteur aux androgènes (AR) restreint aux cellules de Sertoli (modèle de souris SCARKO [Tan, K.A. 2005]) provoque des défauts de spermatogenèse dès l'entrée en méiose I, et donc conduit à une infertilité mâle. Ceci montre le rôle primordial de la T dans la maintenance de la spermatogenèse. Des études transcriptomiques conduites sur les testicules de différents modèles murins présentant des déficits en AR [65, 66] [67, 68] ont montré que la T régulerait des processus Sertoliens

impliqués dans la maintenance du cytosquelette, le métabolisme de la vitamine A, la régulation de la barrière hémato-testiculaire et la composition du fluide testiculaire.

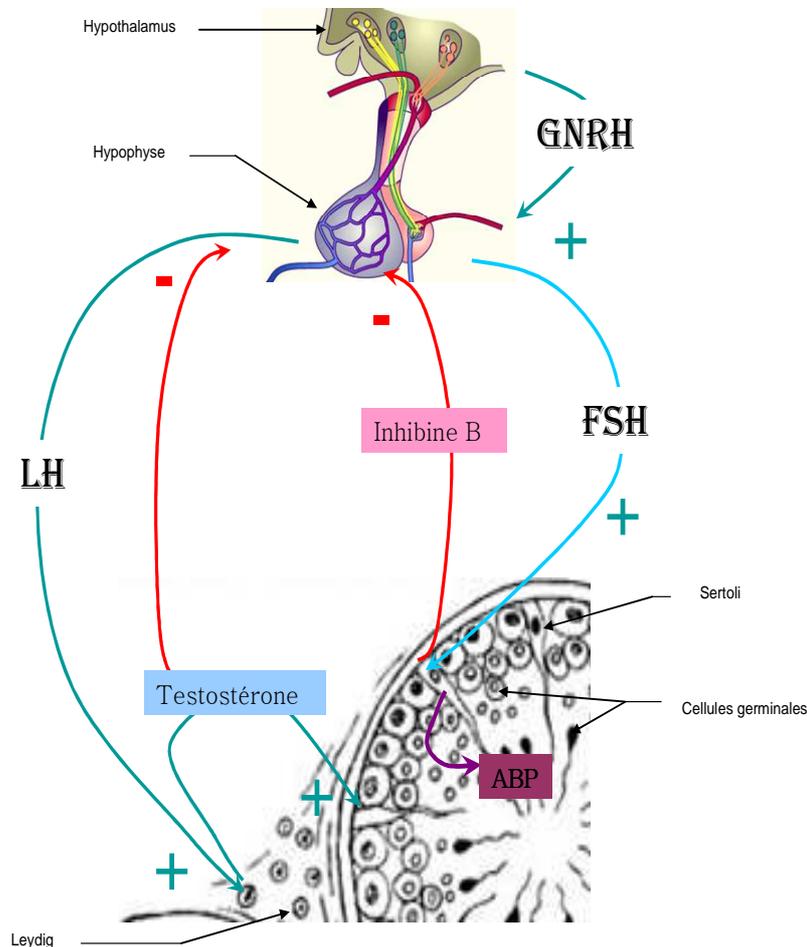


Figure 6 Axe hypothalamo-hypophysaire testiculaire et régulation de la fonction testiculaire

L'hypophyse sécrète deux hormones LH et FSH sous l'action stimulatrice de l'hypothalamus via la GnRH. La LH stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig, qui en retour inhibe la sécrétion de LH. La FSH active la synthèse de certaines protéines dans les cellules de Sertoli, et notamment l'inhibine B qui inhibe la sécrétion de FSH, et l'ABP qui concentre la testostérone.

Sous l'action de la FSH, les cellules de Sertoli produisent et sécrètent le récepteur ABP (*androgen binding protein*) à forte affinité pour la T. Cette sécrétion permet la concentration de la T dans les tubes séminifères. La T va agir sur les récepteurs aux androgènes des cellules de Sertoli afin de stimuler la maturation des cellules germinales [69] (Figure 6). Le complexe ABP-T est transporté via le fluide testiculaire jusqu'à l'épididyme, où il induirait l'expression spécifique de gènes [70].

ii Mise en place de la spermatogenèse, la première vague.

La spermatogenèse chez la souris dure 35 jours, le temps nécessaire pour passer du stade spermatogonie B au stade spermatozoïde. Elle débute par la méiose après la naissance, dans le testicule pré-pubère, à environ 7 JPP : c'est la « première vague ». Cette première vague de la spermatogenèse se déroule de la même façon qu'un cycle de spermatogenèse normale, mais plus rapidement [71].

La spermatogenèse se divise en trois phases : la phase proliférative pré-méiotique, la phase méiotique, et la phase de maturation post-méiotique appelée spermiogenèse. A chacune de ces phases sont associés des types cellulaires particuliers de cellules germinales (Figure 7).

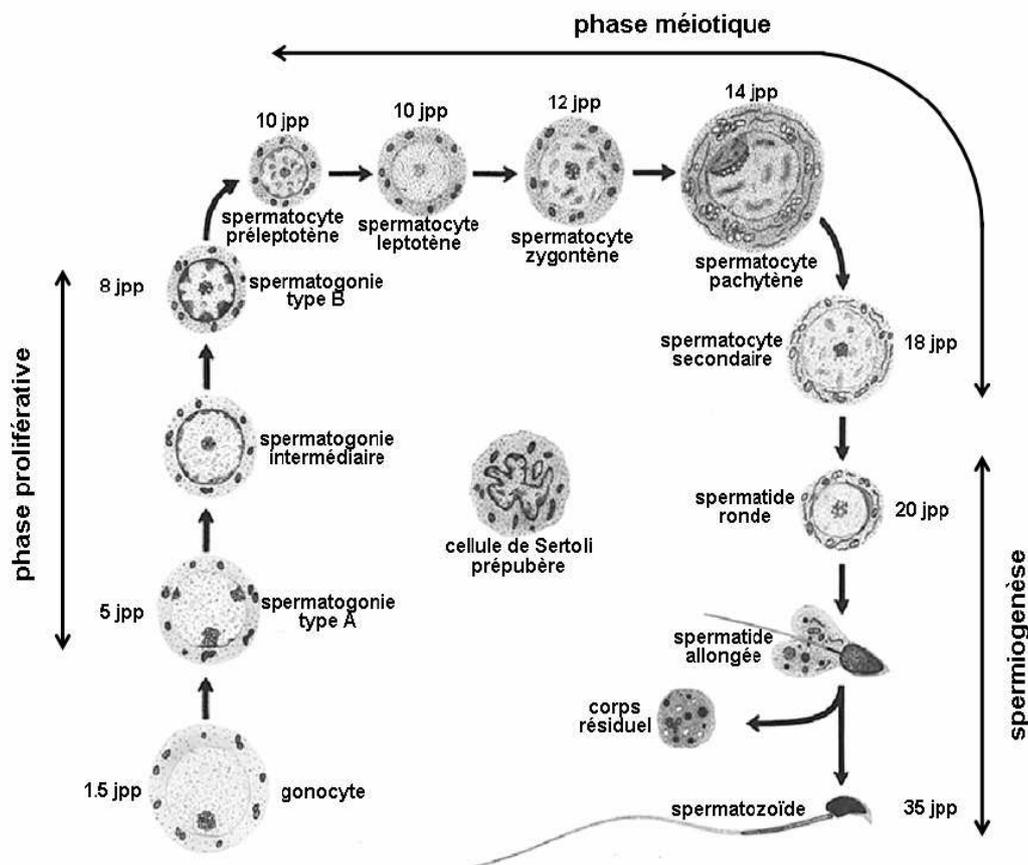


Figure 7 Les différentes phases de la spermatogenèse au cours de la première vague et les cellules germinales qui y sont associées.

Jpp : âge en jours *post partum*

D'après *Bellve et al., 1977* [11] et de *Rooij et al., 2001* [16]

Premier La phase proliférative

Cette phase concerne les spermatogonies, population de cellules souches diploïdes au contact avec la lame basale du tube. Ces cellules se divisent par mitose, afin de conserver un stock de cellules souches tout au long de la vie. Les processus de gestion de cette population sont très complexes, et font intervenir de nombreux intermédiaires cellulaires, entre la spermatogonie de type A, cellule stock, et la spermatogonie de type B, qui entrera en méiose [72].

Deuxième La phase méiotique

A 7 JPP environ, une partie des spermatogonies A quitte le pool des spermatogonies en prolifération pour entrer en méiose, on les nomme spermatogonies B. La spermatogonie B subit une dernière division de mitose qui donne naissance à deux spermatocytes I qui entrent en prophase de méiose I. La première division de méiose (dite réductionnelle) pendant laquelle la recombinaison entre chromosomes homologues prend place, sépare les chromosomes homologues, et donne naissance aux spermatocytes de type II, la première génération de cellules haploïdes. Chacun des spermatocytes II subit alors une division dite équationnelle qui sépare les chromatides sœurs de chaque chromosome donnant naissance à deux spermatides.

Troisième La phase post-méiotique

La spermiogenèse est le processus qui transforme une spermatide ronde, à la chromatine active, en un spermatozoïde : cellule flagellée, à la chromatine compacte et inactive, et qui ne possède quasiment plus de cytoplasme. Il s'agit d'un processus continu que l'on divise en 16 étapes chez la souris.

Chacune de ces étapes de la spermiogenèse est associée à une modification morphologique de la spermatide. Les spermatides rondes sont associées aux stades 1 à 8. Pendant ces étapes, l'acrosome (une vésicule remplie d'enzymes lytiques coiffant le noyau de spermatozoïde) se forme progressivement à partir de l'appareil de Golgi notamment, un des centrioles s'allonge pour donner l'axonème du flagelle et le cytoplasme est rejeté à l'extrémité basale de la cellule. Au stade 9, le noyau de la spermatide commence à s'allonger et la chromatine se compacte progressivement. Le flagelle continue à grandir et à se structurer. Au stade 16, les spermatides allongées en fin de différenciation (ou spermatozoïdes) sont libérées dans la lumière du tube séminifère : c'est la spermiation.

Dans les chapitres qui vont suivre, je décrirai plus en détail les mécanismes de formation de différents organelles du spermatozoïde.

– Formation de la tête

La tête du spermatozoïde se compose d'un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire, elle-même entourée d'une matrice protéique, la thèque périnucléaire. Arrimé à cette thèque, l'acrosome surmonte une partie du noyau. On nomme post-acrosome, la partie du noyau non recouverte par l'acrosome. La tête est enveloppée par la membrane plasmique. (Figure 8).

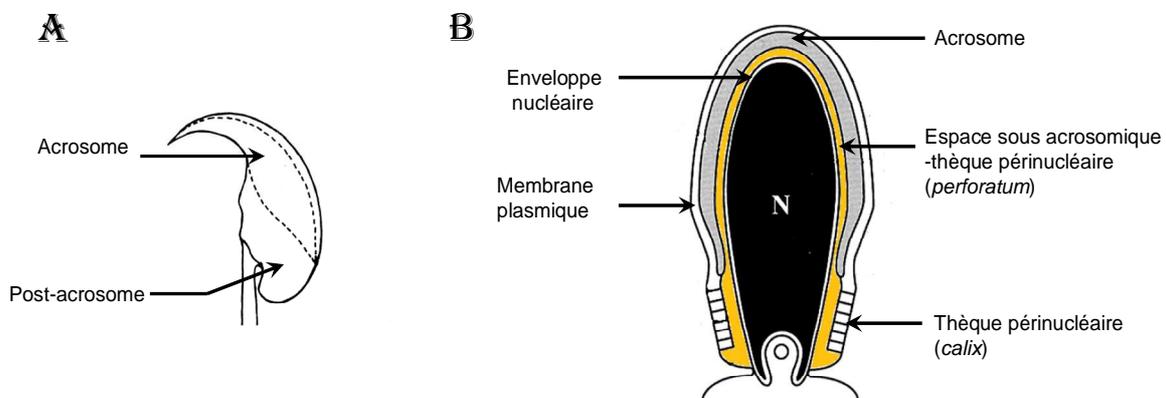


Figure 8 Dessins de la tête d'un spermatozoïde de souris.

A : Dessin en vue externe

B : Dessin de coupe longitudinale de la tête

Extrait de *Toshimori K et al. 2003* [9]

La formation de la tête du spermatozoïde consiste en trois événements majeurs : la condensation de la chromatine, la modification morphologique du noyau et la formation de l'acrosome. Ces trois événements ne sont pas indépendants : par exemple, une absence d'acrosome est souvent combinée à des anomalies de la morphologie du noyau (térazoospermie). De même, les structures qui interviennent dans l'aplatissement et l'ancrage de la vésicule acrosomique seraient aussi en interaction avec les processus de compaction de l'ADN [73].

Au cours de mes travaux de thèse, je me suis notamment intéressé à un phénotype de térazoospermie. Dans le chapitre qui suit, je vais donc décrire plus précisément les processus et les structures impliqués dans la formation de la tête du gamète mâle.

Premier Biogenèse de l'acrosome

On distingue plusieurs phases dans la biogenèse de l'acrosome (Figure 9) :

- La phase granule : le granule acrosomique provient de la fusion de pro-granules dérivés de l'appareil de Golgi aux stades spermatocytes. Initialement placés au dessus du noyau, à proximité du trans-golgi, ils fusionneraient en un unique granule qui se fixe sur la plaque acroplaxomique, aux stades 3-4 de la spermiogenèse (voir figure 14).
- La phase golgienne : Le granule s'étale progressivement sur le noyau rond de la spermatide, guidé par l'anneau marginal de l'acroplaxome, (cf. chapitre suivant) pour former la vésicule acrosomique. Des vésicules d'origine golgienne contenant du matériel acrosomique fusionnent avec l'acrosome en développement [74]. Cette phase se poursuit jusqu'au stade 8 de la spermiogenèse.
- La phase acrosome : alors que le noyau de la spermatide s'allonge, l'acrosome recouvre la partie antérieure du noyau.

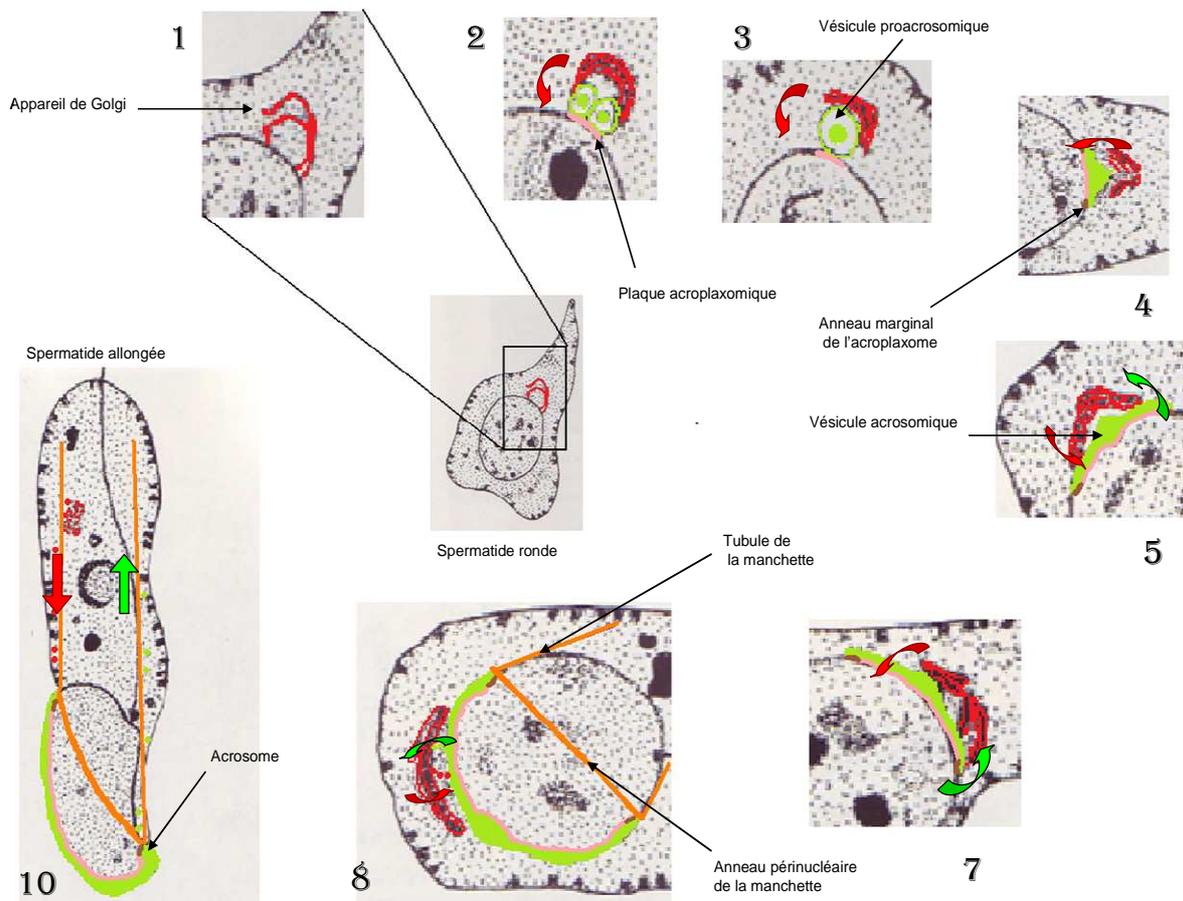


Figure 9 Biogenèse de l'acrosome

Les spermatoïdes des étapes 1 à 10 sont représentés. La phase granule est observable aux étapes 2 et 3. Dès l'étape 4, l'acrosome en formation s'étale sur le noyau, maintenu et guidé par l'acroplaxome. Pendant le développement de l'acrosome, un trafic vésiculaire entre l'organelle en formation et l'appareil de Golgi en dégradation peut être observé. La manchette, qui apparaît à l'étape 8, est potentiellement impliquée dans ce trafic lors des étapes postérieures de maturation. Les dessins des spermatoïdes sont extraits de *Evaluation of the testis* Russel et al. Edition 1990 [7]

L'appareil de Golgi a migré loin de l'acrosome, dans le cytoplasme de la spermatoïde, cependant, il est décrit qu'il existe encore un trafic de vésicules entre l'appareil de Golgi en dégradation et l'acrosome en maturation [75]. Ce trafic serait réalisé par l'intermédiaire des microtubules [76] ce qui constitue un argument en faveur du transport via la manchette (Figure 9). La présence des protéines Rab5 et Rab7 dans l'acrosome en maturation indique une contribution des endosomes et des lysosomes dans la biogenèse de l'acrosome. La présence transitoire de protéines marqueurs de l'appareil de Golgi (golgin 97, mannosidase II, par exemple), durant la phase golgienne, mais non retrouvées dans l'acrosome des spermatozoïdes matures, suggère l'existence d'un processus actif « d'épuration » du contenu

acrosomique [74], cohérent avec la présence de la protéine b-COP dans l'acrosome en maturation (normalement retrouvée sur les vésicules du cis-golgi, elle participe au recyclage interne de l'appareil de Golgi [77]). Ainsi, de l'acrosome en maturation bourgeonneraient des vésicules contenant des composants golgiens inutiles qui seraient ensuite ré-adressées vers l'appareil de Golgi via la manchette.

Ce transport de matériel depuis les unités de production cellulaire vers les structures de la spermatide prend place aussi pour la fabrication du flagelle.

Deuxième Les cytosquelettes de la spermatide

Plusieurs structures apparaissent dans la spermatide ronde et en allongement : l'acroplaxome, la manchette et la thèque périnucléaire. Ces structures ont été proposées lors de leurs premières descriptions comme impliquées dans la morphogenèse de la tête du spermatozoïde [78]. Des données plus récentes et notamment l'analyse de mutants de constituants de ces structures, ont permis de montrer leur implication dans la biosynthèse de l'acrosome, sans pour autant invalider leur rôle potentiel dans le modelage du noyau. Si la thèque périnucléaire est retrouvée dans les spermatozoïdes épидидymaires, l'acroplaxome et la manchette, en revanche, sont des structures transitoires.

- L'acroplaxome:

L'acroplaxome est une structure présente dans l'espace entre le noyau en allongement et l'acrosome en formation. Elle est composée principalement de microfilaments d'actine et de kératine 5. Elle est constituée de deux parties (Figure 10 A et B) :

- l'anneau marginal, un anneau de matériel dense entourant la tête du spermatozoïde, à la jonction de la membrane nucléaire et de l'extrémité de l'acrosome.

L'anneau marginal apparaît dès l'étalement de l'acrosome sur le noyau (étapes antérieures à l'étape 8), et progresse en guidant le bord de l'acrosome jusqu'aux stades tardifs de la spermiogénèse au cours desquels il est désassemblé [79].

- la plaque acroplaxomique, occupant tout l'espace sub-acrosomique [79]. L'actine filamenteuse de la plaque acroplaxomique serait un point d'ancrage et de guidage de la vésicule pro-acrosomique, puis des vésicules d'origine golgienne qui fusionnent avec l'acrosome en développement.

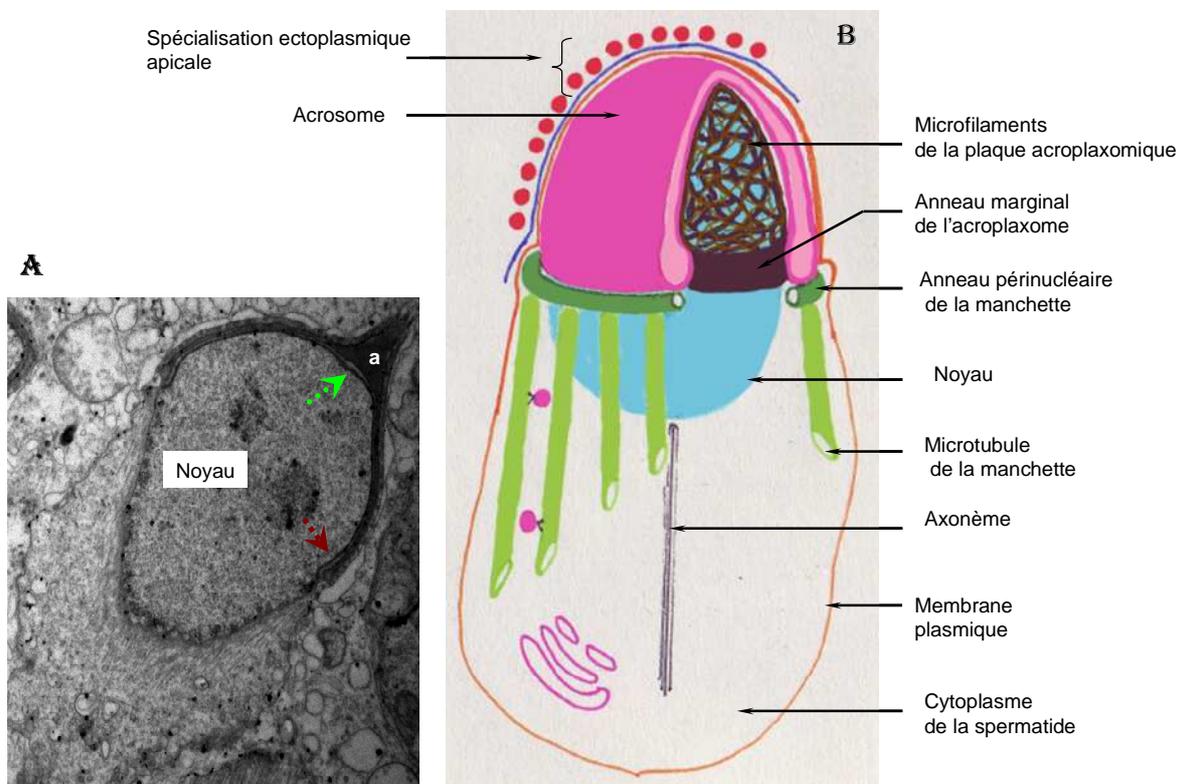


Figure 10 Structure de la spermatide en allongement

A) Photographie en microscopie électronique à transmission (X10 000) d'une spermatide étape 9 de souris B6

La flèche rouge indique un épaissement dense aux électrons à proximité de l'extrémité de l'acrosome (a), il s'agit de l'anneau marginal. La plaque acroplaxomique est indiquée par la flèche verte, dans l'espace sous acrosomique.

B) Dessin d'interprétation :

-L'anneau marginal et la plaque acroplaxomique entourent le noyau entre l'enveloppe nucléaire et l'acrosome.

-Dans le cytoplasme de la spermatide, l'anneau périnucléaire de la manchette entoure le noyau, juste sous l'acrosome. Les microtubules du manteau sont accrochés à l'anneau et longent le noyau.

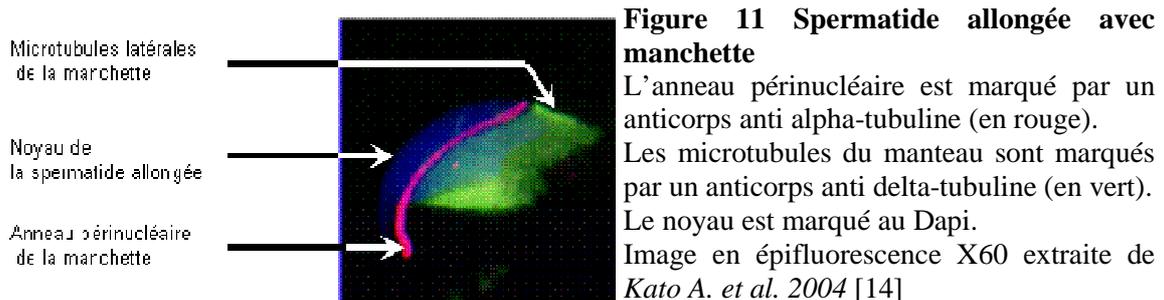
-Dans le cytoplasme de la cellule de Sertoli, le réseau d'actine de la spécialisation ectoplasmique apicale coiffe la spermatide.

L'anneau marginal fait face à une structure en anneau placée dans le cytoplasme de la spermatide : l'anneau de la manchette (Figure 10 B).

- La manchette:

La manchette est une structure constituée de microtubules (tubuline alpha et delta essentiellement [14]) Elle se compose de deux parties :

- l'anneau périnucléaire, un anneau de tubuline alpha, encerclant le noyau de la spermatide,
- le manteau, un ensemble de microtubules greffés sur l'anneau périnucléaire. Ces microtubules descendent dans le cytoplasme de la spermatide en longeant le noyau, parallèlement au flagelle en formation (Figure 9, 10 B et 11).



L'anneau périnucléaire, qui est positionné en face de l'anneau marginal (ces deux structures sont séparées par une invagination de la membrane plasmique), est lié à la membrane plasmique de la spermatide [80-82].

Des défauts affectant la manchette ont été associés à des anomalies de la forme du noyau des spermatozoïdes. Dans un mutant naturel nommé *Azh* (*abnormal spermatozoon head shape*, mutant entraînant la perte de fonction du gène *Hook1* [83]), il a été observé une forte tératozoospermie, associée à un mauvais positionnement de la manchette par rapport au noyau de la spermatide. [84]. D'autres mutations de protéines associées à la manchette ont été associées à des anomalies de morphologie du noyau : *Rimbp3* [85], *E-MAP-115* [86], ou *Clip-170* [87].

La manchette intervient aussi dans le positionnement de l'acrosome sur le noyau et dans le processus de sa biogenèse: par exemple, des travaux récents ont montré que les spermatozoïdes *Azh* possédaient un acrosome, mais que celui-ci était souvent mal placé [88]. Concernant l'inactivation du gène *Rimpb3*, il a été noté une accumulation de matériel dans l'acrosome en formation, ainsi que des défauts de livraison des vésicules pro-acrosomiques à l'acrosome, suggérant un rôle de transport bidirectionnel de matériel vésiculaire entre l'acrosome et le cytoplasme, par l'intermédiaire de la manchette.

Il est aussi possible que la manchette interagisse avec les processus de condensation de la chromatine. En effet, la protéine Ran-GTPase décrite comme impliquée dans le transport de protéines au travers de l'enveloppe nucléaire, est stratégiquement placée au niveau de l'anneau périnucléaire [73]. Elle pourrait intervenir dans l'échange des histones somatiques contre les nucléoprotéines spermatiques, les différentes protéines étant convoyées par le transport intra-manchette.

L'acroplaxome et la manchette sont des structures que l'on ne retrouve pas dans les spermatozoïdes matures. Ces deux cytosquelettes sont désassemblés lors des phases tardives de la spermiogenèse. Une structure vient alors en remplacement de l'acroplaxome, la thèque périnucléaire.

- La thèque périnucléaire :

La thèque périnucléaire (TP) est un cytosquelette continu entourant le noyau des gamètes mâles matures. Elle n'apparaît définitive que dans les stades tardifs de la spermiogenèse [89] On peut la diviser en deux parties : une partie sub-acrosomique (nommée *perforatum*), et une partie post-acrosomique (*calix*) (Figure 8 et 10 B). Trois rôles ont été proposés pour la TP :

- un rôle de modelage du noyau [90].
- un rôle d'ancrage de l'acrosome.
- et un rôle indirect dans l'activation ovocytaire lors de la fécondation [91].

Les composants de la TP sont assemblés pendant la spermiogenèse ; ils proviendraient soit d'un transport en association aux vésicules qui formeront l'acrosome (pour le *perforatum* notamment) [92], soit du transport microtubulaire le long de la manchette (pour la partie *calix*).

On distingue :

- des composants interagissant avec l'actine (*calicin* [93], *cyclin II* [94], *Capping Actine* protéine (CAP) *alpha 3* [95] et *Beta 3* [96] ou encore des « actin related protein » (*Arp-T1* et *T2* [97] et *FSCN3* [98]) ;
- des composants impliqués dans la formation de l'acrosome (par exemple *Fabp9* (*fatty acid binding protein 9, testis*) [99]) ;
- des variants d'histones comme *subH2Bv* [100] ou encore des histones somatiques [101] ;
- des protéines de la famille des *CYPT* (*CY*steine-*rich Perinuclear Theca* protein) dont le rôle n'est pas élucidé [102] [103].

Il semblerait que le *perforatum* de la TP soit la structure de remplacement de la plaque acroplaxomique dans le gamète mature. Il s'agit probablement d'une structure de stabilisation, et de protection du noyau sur laquelle est fixé l'acrosome.

Troisième Condensation de la chromatine

La chromatine des cellules germinales subit un remodelage important, dès l'entrée en méiose. Dans la spermatide en allongement, les histones du nucléosome (un nucléosome est un fragment d'ADN d'environ 200 bp entourant un octamère d'histone de cœur (H2A, H2B, H3 et H4)) sont remplacées par des protéines dites de transition (*Tnp1* et *Tnp2*) qui elles-

mêmes seront remplacées par les protamines (*prm1* et *prm2*) (constituant une unité nucléoprotéique de 15 bp environ).

Les protéines de transition apparaissent aux stades 12 – 13 de la spermiogenèse, alors que les histones sont enlevées de la chromatine, et que celle-ci se condense. L'invalidation de chacune d'entre elles conduit à une hypofertilité plus ou moins sévère, et à des anomalies des gamètes mâles, mais elle ne conduit qu'à des anomalies subtiles de la condensation de la chromatine [104] [105]. La double invalidation *Tnp1* et *Tnp2* a été réalisée, montrant des anomalies majeures de la morphologie des gamètes, et de leur production, ainsi qu'une condensation partielle de la chromatine conduisant à une stérilité mâle [106]. L'invalidation des gènes des protamines 1 et 2 dans des souris chimériques (possédant à la fois des cellules avec le gène normal, sur un fond génétique C57BL6, et des cellules avec le gène muté, sur fond 129sv) a montré, des défauts de compaction de la chromatine, et des cassures de l'ADN des gamètes *prm2*^{-/-} [107].

Le changement de structure de la chromatine dans la spermatide en allongement fait intervenir d'autres nucléoprotéines, de façon transitoire, et notamment des variants des histones somatiques. Elles sont parfois essentielles à la fertilité mâle : par exemple, l'invalidation d'un variant de l'histone H1, *HIT2* conduit à une tératozoospermie associée à une réduction de la fertilité mâle [108].

Le remplacement des histones dans le spermatozoïde mature n'est pas total, il a été décrit des régions chromatiniennes péricentriques, conservant une organisation à base d'histones [109]. Cette hétérogénéité nucléaire pourrait être impliquée dans l'empreinte épigénétique paternelle, soit dans sa mise en place (offrant une structure ouverte aux modifications épigénétiques) soit en constituant elle-même une marque épigénétique (premières régions à être transcrites après fécondation).

La condensation de la chromatine semble ne pas être un processus indépendant des autres processus de différenciation du spermatozoïde. Quelques exemples suggèrent qu'il existe un lien entre la condensation de la chromatine, sa régionalisation et la formation des structures acrosomiques : par exemple, l'inactivation de *Tnp1* conduit à des anomalies d'ancrage de l'acrosome ; mais aussi, des histones ont été localisées dans la thèque périnucléaire chez le bovin [100, 101], région importante dans le processus d'ancrage de l'acrosome.

La spermatide en différenciation est nourrie et protégée par la cellule de Sertoli. Celle-ci établit un contact étroit avec la spermatide, notamment en l'entourant d'une structure de maintien complexe et unique : la spécialisation ectoplasmique (SE). Celle-ci semble avoir des rôles multiples, et être potentiellement impliquée dans la morphogénèse de la tête des spermatozoïdes.

Quatrième La spécialisation ectoplasmique (SE)

La spécialisation ectoplasmique est composée de faisceaux d'actine compris entre la membrane plasmique de la cellule de Sertoli et du réticulum endoplasmique (RE). Cette structure existe à deux endroits dans la cellule de Sertoli (Figure 12) :

- en position basale, au niveau de la barrière hémato-testiculaire (BHT). L'actine y forme une ceinture au pourtour de la cellule de Sertoli. A ce niveau, chaque cellule de Sertoli possède les trois compartiments (membrane, actine, RE) placés en regard, créant une structure symétrique (Figure 12). La SE basale participe à la définition des deux compartiments testiculaires de part et d'autre de la BHT (compartiment basal et luminal). Son ouverture permet la migration des cellules pré-méiotiques vers le compartiment luminal, où elles effectuent leur méiose et leur différenciation [110].

- en position apicale, on retrouve la SE au niveau du contact spermatide-Sertoli, uniquement du côté Sertolien (Figure 12). Elle apparaît approximativement au stade 8 [111], stade pendant lequel une structure d'actine est clairement observable dans le cytoplasme Sertolien, coiffant l'acrosome en développement. La SE apicale est maintenue jusqu'à la spermiation, au cours de laquelle elle est désassemblée. Il est intéressant de noter que la spermiation correspond aussi au moment de la migration du spermatocyte pré-leptotène au travers de la BHT. Plusieurs travaux ont montré que la spermiation et cette migration étaient co-régulées, et que les processus concomitants de désengagement des SE basales et apicales participaient à cette co-régulation [112].

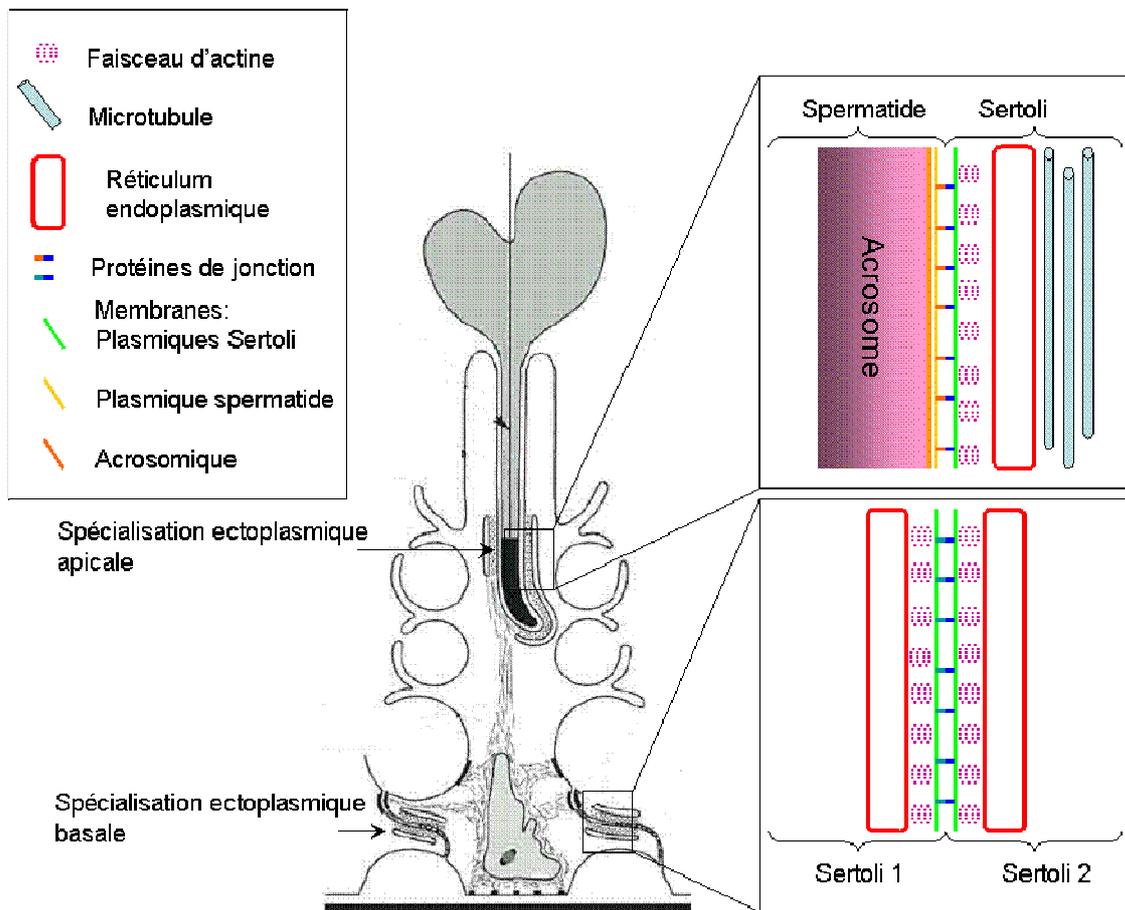


Figure 12 Dessin des spécialisations ectoplasmiques basales et apicales

La spécialisation ectoplasmique apicale a un rôle dans l'ancrage des cellules germinales au sein de l'épithélium séminifère. En effet, l'intégrine alpha 6 beta 1, protéine impliquée dans le contact cellulaire, est retrouvée enchâssée dans le compartiment membranaire de la SE [113]. L'invalidation du gène de la *nectine-2*, une autre protéine de contact retrouvée dans le même compartiment, conduit à une infertilité mâle liée à une tératozoospermie, indiquant une implication de la SE apicale dans la morphogénèse de la tête [114].

Il est aussi proposé un rôle dans le positionnement et la translocation des cellules germinales dans l'épithélium séminifère. Cette fonction serait assurée grâce à un ensemble de microtubules localisés à l'extérieur de la SE, le long des saccules de RE [15] (Figure 12). Ces microtubules serviraient de rails pour déplacer la spermatide accrochée par la SE apicale.

Les filaments d'actine de la SE ont une organisation originale en faisceaux octogonaux. Un rôle de modelage mécanique du noyau de la spermatide avait été proposé pour ce réseau d'actine, qui aurait, par des propriétés contractiles, contraint le noyau. Cependant, une étude a permis de montrer que l'actine de la SE n'avait pas de propriété contractile [111]. La fonction de ce réseau d'actine n'est pas élucidée à ce jour.

En microscopie électronique, on peut voir des liens entre les faisceaux d'actine et les membranes du réticulum d'une part et entre les faisceaux d'actine et la membrane plasmique de la spermatide d'autre part. Des protéines connues pour interagir avec l'actine sont retrouvées dans ce compartiment : la fimbrine, une protéine connue pour induire la formation de faisceau d'actine [115], ainsi que l'alpha-actinine [116], une autre protéine de la super famille des *F actin cross linking protein*. Plus récemment, une nouvelle protéine capable de former des faisceaux d'actine a été découverte dans la spécialisation ectoplasmique, l'*ectoplasmic specialization protein* : l'*Espin* [117]. Cet effecteur a ensuite été retrouvé dans tous les organes présentant des structures villositaires, comme l'intestin, le rein, et l'oreille

interne (dans les stéréociles). Un mutant murin de ce gène existe, le mutant naturel Jerker, qui présente une surdité et des défauts d'équilibre. Nous nous sommes intéressés à ce gène comme candidat aux tératozoospermies que nous avons observées dans une de nos lignées. Ce point sera traité en II.A.2.b.

– Formation du flagelle

Le flagelle du spermatozoïde de mammifère est formé de trois parties distinctes : la pièce intermédiaire, contenant les mitochondries, organites produisant l'énergie nécessaire au mouvement, et la pièce principale et la pièce terminale (Figure 13).

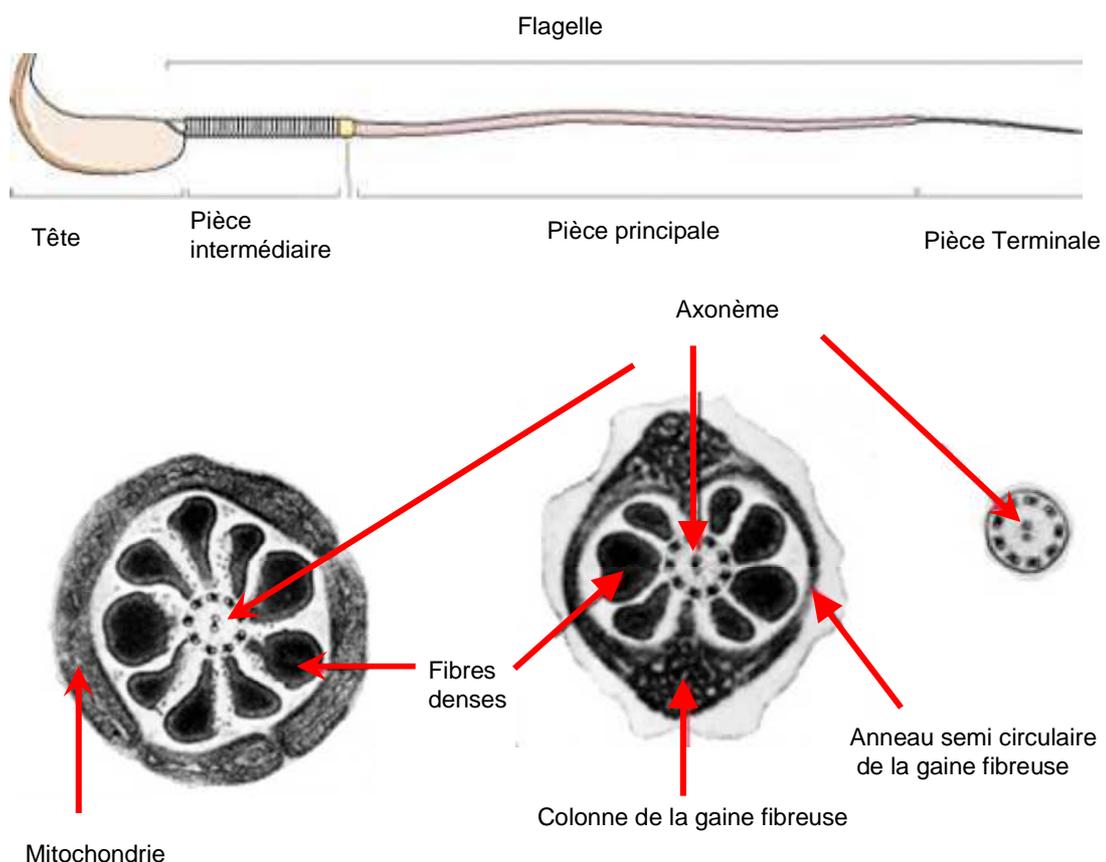


Figure 13 Structure du flagelle d'un spermatozoïde de souris. Coupes transversales en microscopie électronique.

Le flagelle se compose de trois parties : la pièce intermédiaire, contenant les mitochondries, la pièce principale et la pièce terminale. L'axonème, en position centrale, parcourt tout le flagelle. Des structures périaxonémales sont observables : les fibres denses dans la pièce intermédiaire et principale, et la gaine fibreuse dans la pièce principale seulement.

Le flagelle se développe dès les phases précoces de la spermiogenèse. Sa formation commence par l'allongement de l'axonème à partir d'un des deux centrioles. L'axonème consiste en une paire centrale de microtubules entourée de 9 doublets périphériques de microtubules auxquels sont associés de nombreuses protéines [118], comme la dynéine (protéines moteurs du mouvement), la tektine, ou la néxine. Des structures rayonnantes, les ponts radiaires, sont ancrées sur les doublets périphériques et se projettent vers la paire centrale. L'axonème est la structure pivot du flagelle, elle est retrouvée au centre sur toute sa longueur.

Au niveau de la pièce intermédiaire et de la pièce principale, les neuf fibres denses de longueurs variables entourent l'axonème. Les fibres denses apparaissent en cours de spermiogenèse, comme des prolongements des colonnes segmentées présentes au niveau du cou, structure cytosquelettique retrouvée juste sous le noyau [119]. Les fibres denses auraient un rôle dans la flexibilité du flagelle et dans le mouvement. Dans la pièce principale, en périphérie des fibres denses se trouve la gaine fibreuse, structure de remplacement des mitochondries de la pièce intermédiaire. Il s'agit d'une structure cylindrique comportant deux épaisissements, appelés colonnes longitudinales, reliées entre elles par les anneaux semi circulaires. Elle se forme de façon distale à proximale, à l'inverse des fibres denses et de l'axonème. La gaine fibreuse a la même composition que les fibres denses (protéines ODF : *outer dense fiber*) [120], à laquelle s'ajoute majoritairement l'enzyme Akap4 (A-Kinase Anchor Protein 4) [121] et des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique. La gaine fibreuse est donc probablement impliquée dans la régulation de la mobilité.

La pièce intermédiaire se compose d'un manchon de mitochondries entourées en hélice autour des fibres denses. A l'extrémité du manchon mitochondrial, on trouve une structure protéique dense, en anneau, reliée à la membrane plasmique : l'annulus. L'annulus serait impliqué dans la formation du manchon [122] et dans la régionalisation du

spermatozoïde, constituant une barrière de diffusion [123].

A la spermiation, le spermatozoïde possède l'ensemble de ces structures. Cependant, ce spermatozoïde est immobile et incapable de féconder un ovocyte. Des événements de maturation vont avoir lieu dans l'épididyme permettant, entre autres, l'acquisition du mouvement progressif. Le spermatozoïde éjaculé subira encore d'autres événements de maturation dans les voies femelles pour acquérir son aptitude à féconder.

iii Organisation spatiotemporelle de la spermatogenèse

Dans les tubes séminifères des testicules des rongeurs, il existe des associations précises de types cellulaires différents, par section de tube à un moment donné. Ces associations correspondent à des stades de l'épithélium germinatif (Figure 14).

Par exemple, pour le stade VIII, un spermatocyte I en préleptotène de mitose I est retrouvé associé à un spermatocyte I en prophase de méiose I, à une spermatide de stade 8, et à un spermatozoïde en spermiation.

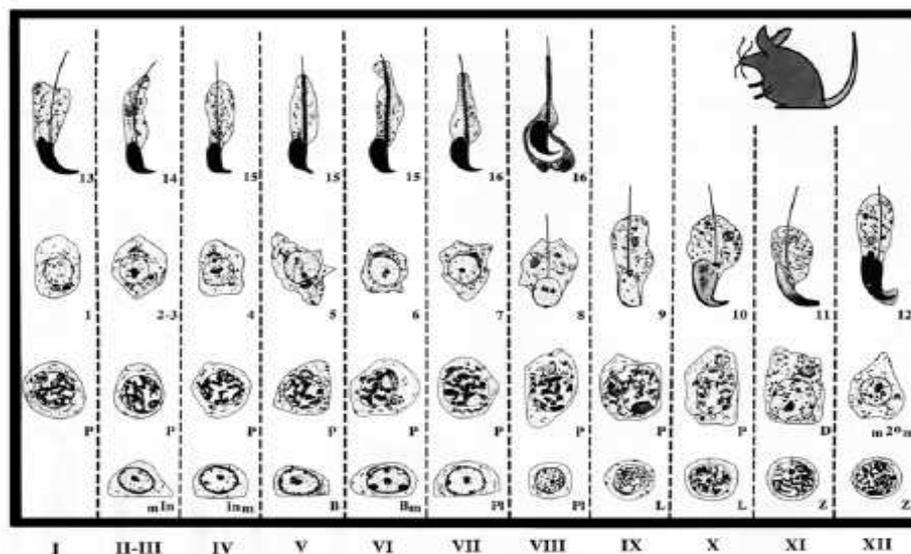


Figure 14 Tableau des stades de la spermatogenèse chez la souris

Les stades correspondent aux associations cellulaires retrouvées dans les sections de tubes séminifères. Il y en a 12 chez la souris (I à XII). La spermiogenèse comprend 16 étapes chez la souris (1 à 16).

Extrait de *Evaluation of the testis* Russel et al. Edition 1990

Ces cellules à différents stades de maturation co-existent en contact avec la même cellule de Sertoli, mais occupent des niveaux différents dans la hauteur de l'épithélium séminifère. Un tube séminifère va présenter le même stade (I à XII) sur une certaine longueur, ensuite on trouvera soit le stade précédent, soit le stade suivant.

3. Le spermatozoïde, gamète fécondant

Le spermatozoïde fraîchement éjaculé n'est pas fécondant. Lors de la remontée dans les voies femelles, il acquiert un ensemble d'aptitudes (modification de sa mobilité, capacité à effectuer la réaction acrosomique...) au cours d'une maturation appelée capacitation.

a) Mobilité

i Processus

Le processus conduisant à la formation des courbures flagellaires implique au départ un glissement linéaire, entre deux paires de microtubules adjacentes, grâce à l'hydrolyse de l'ATP mitochondrial, par les dynéines ATPases microtubulaires. Comme ce glissement linéaire est mécaniquement contraint, vraisemblablement par des liens protéiques, il se transforme localement en une courbure de l'axonème. Afin d'obtenir un mouvement flagellaire cohérent, l'initiation du glissement microtubulaire des 9 doublets est asynchrone et asymétrique (seul une moitié du flagelle est concernée à un moment donné). Cette asynchronie est régulée via les structures rayonnantes et le doublet central [124, 125].

ii Activation

Du fait de la présence d'inhibiteurs de la mobilité dans les sécrétions séminales, les spermatozoïdes fraîchement éjaculés sont immobiles. Des facteurs, comme la PSA (prostate specific antigen), ou encore des ions (Zinc) [126], vont permettre d'activer le mouvement flagellaire, essentiel à la remontée dans les voies femelles. Les mécanismes endogènes d'activation du spermatozoïde impliquent l'activation de variants d'enzymes glycolytiques (comme pour le variant de l'hexokinase HK1S [127]).

b) Capacitation

i Définition et processus

Afin que les spermatozoïdes deviennent féconds, un ensemble de processus conduisant à une modification des propriétés membranaires, de la composition ionique interne, et du mouvement, doit prendre place. Cet ensemble de modifications est nommé capacitation. Une fois le spermatozoïde capacité, il peut acquérir le mouvement hyperactif, et est réceptif aux inducteurs de la réaction acrosomique.

ii Modifications membranaires

Les modifications de la membrane plasmique sont des événements précoces de la capacitation. Il est observé une réorganisation des phospholipides membranaires, un efflux de

cholestérol et une augmentation de la fluidité du plasmalemme du gamète [128]. L'efflux de cholestérol est favorisé par une capture par des protéines du milieu environnant comme l'albumine. Une réorganisation de la répartition des protéines est aussi observée, comme dans le cas des protéines Vam6P et SNAP [129]. Ces protéines sont impliquées dans le trafic vésiculaire et la fusion membranaire, leur relocalisation en position acrosomique pendant la capacitation permettra l'exocytose de l'acrosome pendant la réaction acrosomique. Ces événements de capacitation sont dépendants de l'ion bicarbonate. Son entrée dans la cellule provoque l'activation directe de la *soluble adenylyl cyclase* (sAC), et la production d'AMPc qui va activer la protéine kinase A (PKA) [130]. La PKA va, à son tour, activer de nombreux effecteurs cellulaires par phosphorylation (comme les protéines Akap, ou encore la dynéine axonémale [131]).

La capacitation s'accompagne d'une augmentation du pH interne du gamète [132] et d'une hyperpolarisation membranaire [133, 134], dépendante du canal K_{sper} [12]. L'hyperpolarisation de la membrane plasmique est un pré-requis à l'entrée massive de calcium dans le gamète mâle lors du contact avec la zone pellucide ovocytaire, et donc au déclenchement de la réaction acrosomique [135].

iii Le mouvement hyperactivé

L'entrée de bicarbonate ainsi que l'alcalinisation du pH cellulaire vont permettre l'activation des canaux calciques voltage-dépendants K_{sper}, et donc l'entrée de calcium dans la cellule [136, 137]. Cette vague calcique va stimuler en cascade plusieurs voies enzymatiques (kinases calcium dépendantes, sAC, pKA...), aboutissant à l'activation d'effecteurs flagellaires (AKAP4, ODF2...) (Figure 15).

Les spermatozoïdes passent d'un mouvement progressif pendant lequel le battement flagellaire est régulier, et l'oscillation de la tête est de faible amplitude, à un mouvement dit hyperactivé : les oscillations de la tête deviennent de forte amplitude, le battement flagellaire devient asymétrique et frénétique (Figure 15). L'acquisition de ce mouvement serait lié à la nécessité d'explorer un plus grand volume de l'environnement afin de trouver l'ovocyte, une fois que le spermatozoïde est arrivé à proximité. Il aiderait aussi à la traversée du cumulus, amas de cellules de la granulosa entourant l'ovocyte ovulé.

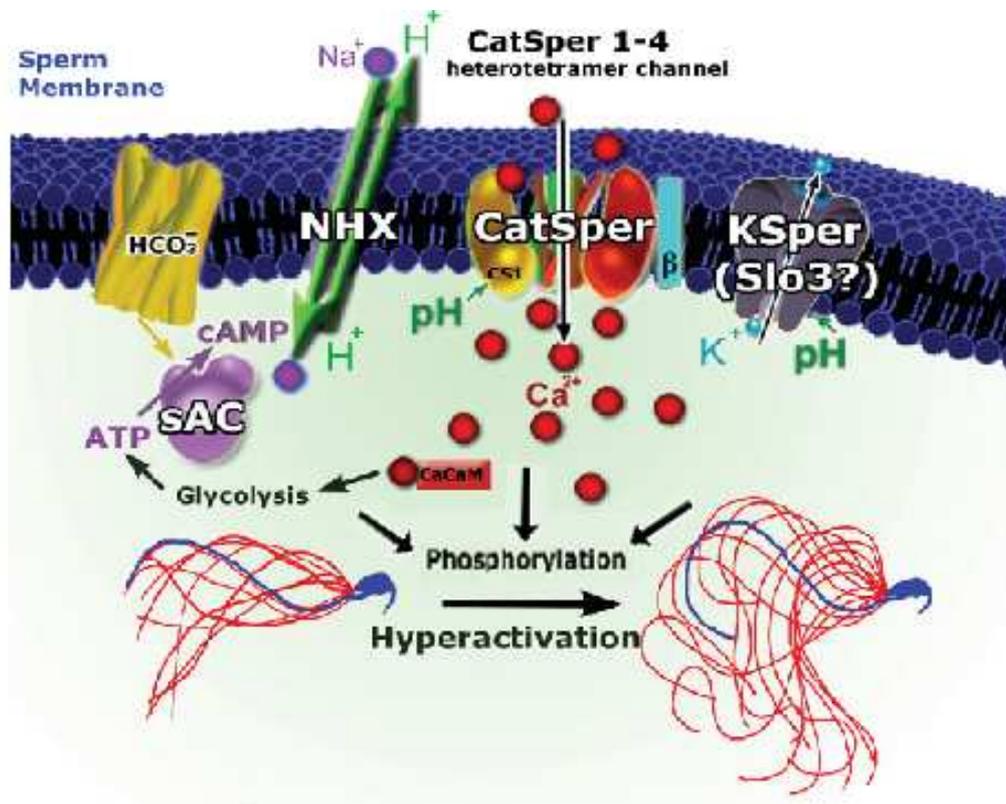


Figure 15 Mécanisme moléculaire de l'acquisition du mouvement hyperactivé du spermatozoïde de souris

L'entrée de bicarbonate et de calcium, permise par l'alcalinisation du cytoplasme et les modifications membranaires de la capacitation, provoque l'activation d'effecteurs flagellaires par phosphorylation. Le mouvement flagellaire devient asymétrique et frénétique.

Extrait de Navarro B. et al. 2008 [12]

c) La fécondation

La fécondation, ou fusion des gamètes mâle et femelle, nécessite que le spermatozoïde traverse le cumulus entourant l'ovocyte, puis la zone pellucide (ZP), et enfin qu'il y ait fusion des membranes plasmiques des deux gamètes.

i La traversée du cumulus

Le cumulus est un amas de cellules entourant l'ovocyte ; ces cellules, issues de la granulosa de l'ovaire, sont prises dans une matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique. Les spermatozoïdes qui la traversent sont capotés en partie, mais leur acrosome est encore intact. Cette traversée est aidée par les hyaluronidases Spam1 [138], Hyal5 [139] et Hyalp1 [140]. L'invalidation de *Spam1* ou le blocage par anticorps de Hyal5 et Hyalp1 provoque un délai dans la traversée du cumulus.

La traversée du cumulus n'est pas une simple épreuve imposée aux spermatozoïdes, elle semble avoir un rôle fonctionnel : la fécondation *in vitro* est plus efficace quand on utilise des ovocytes avec cumulus [141]. Cela semble indiquer que des événements de maturation finale des spermatozoïdes sont déclenchés par cette traversée.

ii La réaction acrosomique : traversée de la ZP et fusion membranaire

Lorsque les spermatozoïdes ont traversé le cumulus, ils heurtent la zone pellucide (ZP). On observe alors un contact entre la ZP et la membrane externe des spermatozoïdes

[142], c'est la fixation primaire. Ce contact permet de déclencher la réaction acrosomique. L'un des composants de la ZP, la protéine ZP3, a été impliqué directement dans ce déclenchement [135]. La liaison entre la ZP3 et des récepteurs spermatiques provoque notamment :

- une activation de protéines G,
- une dépolarisation membranaire,
- une entrée de calcium transitoire [135], via l'activation de canaux calciques voltage-dépendant de type T,
- l'activation de la phospholipase C (PLC) [143], enzyme permettant la libération d'IP3 (Inositol triphosphate), pour lequel la membrane interne de l'acrosome possède des récepteurs [144].

Les récepteurs spermatiques ne sont pas bien connus, de nombreuses pistes sont ouvertes, impliquant probablement des protéines réceptrices organisées en complexes transmembranaires [145].

L'entrée de calcium transitoire et l'activation de la PLC vont induire une libération des stocks de calcium, probablement à partir de l'acrosome lui-même [146], puis une activation des protéines SOC (store-operated channel) [147], conduisant à une élévation permanente du calcium interne. Cette élévation de la concentration interne de calcium, provoque l'exocytose de la vésicule acrosomique. Cette exocytose fait intervenir les protéines de la machinerie de fusion membranaire comme les protéines VAMP et SNARE qui se sont relocalisées pendant la capacitation.

La réaction acrosomique (RA) n'est pas une exocytose classique, elle s'effectue par la fusion locale des membranes plasmiques et acrosomiques externes, créant des pores qui permettent la libération du contenu acrosomique (Figure 16 B). Il s'agit plus d'une

« vésiculation » des membranes, que d'une exocytose de la vésicule acrosomique. Cette vésiculation ne s'opère pas dans la région équatoriale.

La RA effectuée, cette zone membranaire particulière, au niveau équatorial, présente une structuration originale [148] qui serait impliquée dans la fusion gamétique [149]. Des études en microscopie électronique ont montré que la zone équatoriale est une zone privilégiée de la fusion des membranes des deux gamètes [150].

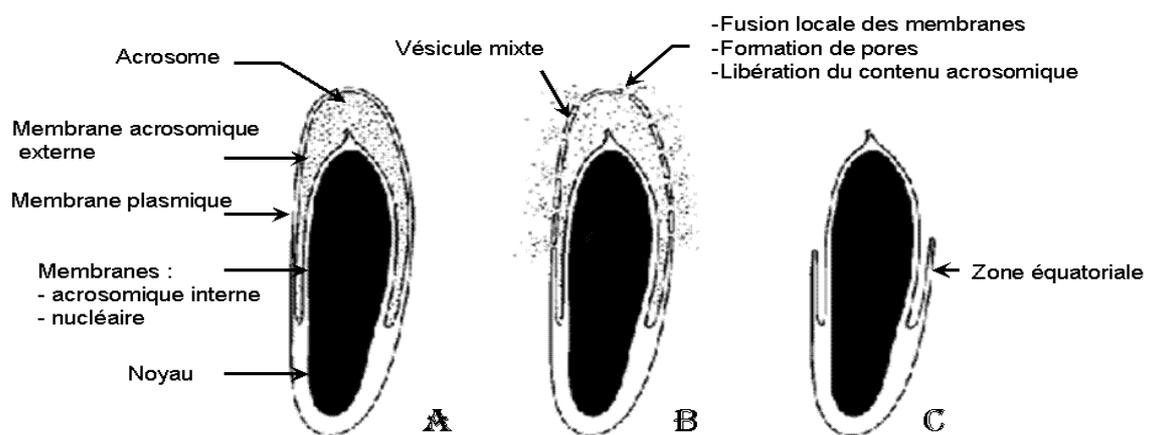


Figure 16 Dessin de la réaction acrosomique

A) Spermatozoïde intact présentant ses 4 membranes : plasmique, acrosomique externe et interne, et nucléaire.

B) Fusion locale des membranes plasmique et acrosomique externe. Cette fusion produit des vésicules mixtes (membranes plasmique et acrosomique) ainsi que des pores, par lesquels est libéré le contenu lytique de l'acrosome.

C) Spermatozoïde réagit : Des régions de la zone équatoriale sont mises à nue, elles interviendront dans la fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte.

Extrait de A. Abou-Haila et D. R. P. Tulsiani 2000 [13]

Par la suite, le spermatozoïde est internalisé par l'ovocyte, son génome sera décondensé, et fusionnera au génome maternel. Le plan de développement du nouvel organisme pourra commencer.

B. La cartographie de QTL

I. Notions de génétique quantitative

a) Le caractère quantitatif

Un caractère quantitatif est un caractère phénotypique dont la distribution est une fonction continue et mesurable (selon souvent une distribution gaussienne, ou gaussienne tronquée), comme la taille, le poids, la quantité de spermatozoïdes produits...Le caractère quantitatif se définit par opposition au caractère qualitatif, comme la couleur des yeux, ou certaines pathologies monogéniques telle la mucoviscidose (la forme majoritaire) pour lesquels il est possible d'établir des classes discrètes de phénotype (bleu-vert-brun, ou malade-non malade). Les traits quantitatifs échappent en apparence aux lois de Mendel. Mendel lui-même avait noté qu'il existe des phénotypes, comme la couleur de la fleur dans l'espèce *pisum* qui ne respectent pas les lois classiques : le croisement en F2 (cf ci-dessous) de plante à fleur blanche et de plante à fleur violette, ne donne pas des descendants soit violet soit blanc dans les proportions définies, mais tout un panel de couleur (Figure 17).

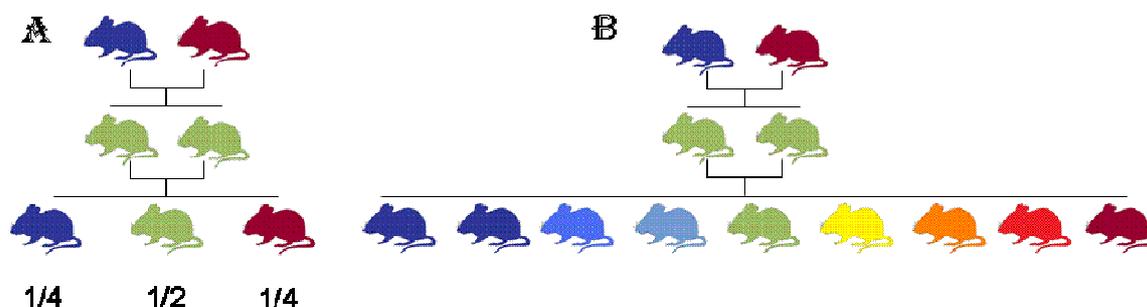


Figure 17 Population F2 dans le cas d'un trait monogénique et d'un caractère complexe
A) La descendance en F2 donne les phénotypes parentaux dans les proportions mendéliennes.
B) En génétique quantitative, plusieurs locus jouent sur le phénotype, avec des niveaux d'implication différents, la population en F2 montre une gradation des phénotypes, les phénotypes extrêmes ne sont pas forcément ceux des parents.

Il est intéressant de noter que Mendel avait proposé une explication à ces « résultats énigmatiques » : le caractère observé devait être contrôlé par plusieurs locus², dont l'action cumulée expliquait la variation phénotypique [151]. Cette hypothèse du polygénisme est l'hypothèse sous-jacente de la théorie de la génétique quantitative (qui étudie les traits complexes, ou quantitatifs). La génétique quantitative est souvent appelée génétique multifactorielle, ou génétique des caractères à déterminisme complexe (caractères complexes par abus de langage). Un caractère qualitatif peut être monogénique (la variation phénotypique n'est déterminée que par la variation allélique d'un seul gène) ou polygénique/oligogénique (la variation phénotypique est contrôlée par l'association de différents allèles (haplotype) d'un nombre limité de gènes), comme dans le cas de la couleur des yeux chez l'humain. Un caractère quantitatif peut être discrétisé en classes (on parle de caractères méristiques). La distinction quantitatif-qualitatif réside donc moins dans la distribution statistique du trait phénotypique, que dans la relation qui lie le génotype et le phénotype.

b) La relation génotype-phénotype

Dans le cas des caractères monogéniques, à déterminisme simple, la connaissance du génotype (quel allèle est possédé par l'individu) permet d'inférer directement et sans ambiguïté le phénotype (malade ou non malade par exemple). Dans le cas des caractères à déterminisme complexe, différents locus agissent sur le phénotype, chacun de façon modérée (et non en tout ou rien) en interaction entre eux (de la simple additivité des effets, à des relations plus complexes), et dont l'action peut être modulée par l'environnement. Il en résulte

² Pour les latinismes, la règle de francisation des pluriels définie par l'académie française est appliquée dans ce document : un locus, des locus

que la connaissance du type allélique à un locus ne permet pas de déterminer le phénotype de l'individu avec certitude, et inversement. La valeur phénotypique individuelle va donc être une fonction du génotype et de l'environnement. De plus, pour des individus élevés dans un même environnement (contrôlé dans la mesure du possible) ayant le même génotype (consanguinité), la mesure phénotypique présentera une variabilité inter-individuelle résiduelle, aléatoire (due à la variabilité de la mesure, ou des effets incontrôlés du microenvironnement ...). La valeur phénotypique P (par exemple le taux de testostérone) s'écrira comme une fonction du génotype G (variants alléliques d'enzymes de la stéroïdogénèse), de l'environnement contrôlé E (mesurable, par exemple le nombre de mâles par cage) et d'un terme aléatoire e (souvent estimé comme gaussien).

$$P = \mu + G + E + e$$

Où μ représente un terme constant du phénotype, c'est la moyenne de la distribution phénotypique.

G pourra se décomposer en autant de termes qu'il y a de locus impliqués. Ces termes sont d'autant plus complexes qu'il existe des interactions non-additives entre les locus et éventuellement entre les locus et l'environnement.

c) Effet génétique additif, ou épistatique

Imaginons un phénotype P , régulé par deux gènes $G1$ et $G2$, tous deux existant sous deux variants alléliques G_{ia} et G_{ib} ($i=1$ ou 2), la représentation de la valeur phénotypique moyenne connaissant les génotypes peut présenter plusieurs cas de figure (Figure 18):

- le cas additif: les génotypes confèrent au phénotype une valeur moyenne, l'effet de $G1$ s'ajoute à l'effet de $G2$ pour chaque combinaison allélique.

- le cas épistatique : les génotypes interagissent entre eux, multipliant leurs effets, ou montrant des relations d'incompatibilité entre allèles. La valeur phénotypique moyenne de l'individu portant la combinaison allélique {G1AA ; G2BB} est différente de la somme des effets G1AA+G2BB (Pour une explication détaillée de l'épistasie et de son importance, se référer à Carlborg et Haley, 2004 [152]).

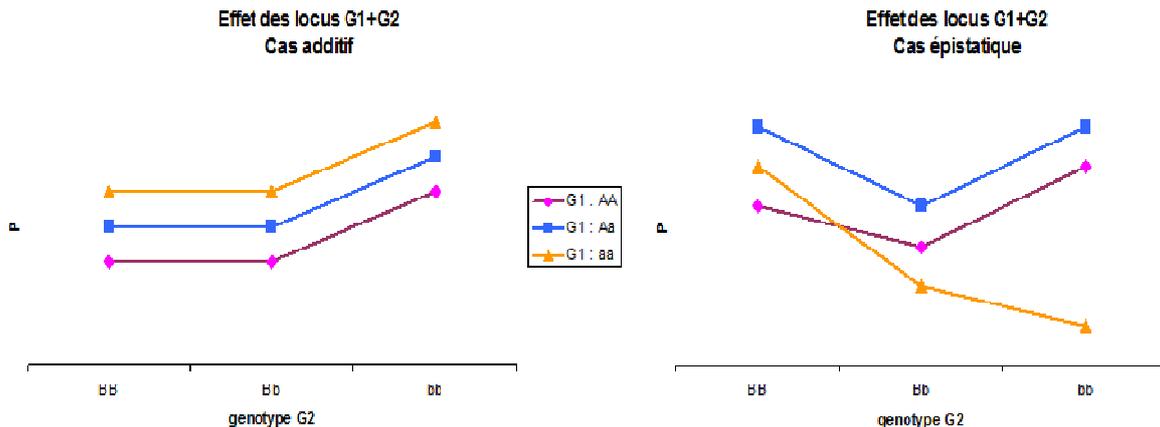


Figure 18 Représentation des valeurs phénotypiques d'un caractère contrôlé par deux locus dans le cas additif et dans le cas épistatique

En abscisse est porté le génotype au locus G2 (BB, Bb ou bb). Pour chaque génotype G2, trois points sont représentés, correspondant aux trois génotypes au locus G1 (AA, Aa ou aa). La valeur phénotypique pour chaque génotype {G1 ; G2} est portée en ordonnée.

Dans le cas additif, chaque allèle de chaque génotype apporte son effet, qui se cumule avec l'effet de l'allèle au second génotype. Les courbes sont parallèles.

Dans le cas épistatique, certaines combinaisons d'allèles donnent des valeurs phénotypiques différentes de la somme des effets des allèles. Les courbes se croisent.

d) Notion de QTL

Dans une population complexe où des variants alléliques sont en ségrégation et dans laquelle on observe une distribution bimodale (au moins) d'un phénotype, on peut souvent observer une association statistique entre une certaine intensité du phénotype et la présence d'un allèle particulier à un marqueur génotypé (un microsatellite ou un SNP : *Single Nucleotid Polymorphism*).

Cette association statistique entre des valeurs phénotypiques et une région du génome indique l'existence dans cette région d'un élément (gène, région d'attachement à la matrice nucléaire, enhancer...) qui intervient dans la régulation du phénotype. Cette région est appelée QTL, pour *Quantitative Trait Locus* : c'est une région qui intervient de façon mesurable, quantitative, dans la régulation d'un phénotype. Un phénotype quantitatif est contrôlé par plusieurs QTL qui agissent chacun avec une certaine force/puissance sur le phénotype. On définit la force d'un QTL comme le pourcentage de variance du phénotype qu'il explique. La détection d'un QTL dans une population sera d'autant plus aisée que la force du QTL est grande.

Le QTL est donc une association statistique entre une déviation phénotypique et une fréquence allélique à un marqueur. Des méthodes d'analyse mathématique de détection de QTL plus ou moins raffinées existent. La plus simple, dite analyse point par point, consiste à tester s'il y a une déviation phénotypique significative compte tenu du génotype à chaque marqueur. Le résultat est exprimé en LOD score, c'est la transformation logarithmique du rapport de la probabilité (P) d'obtenir la déviation phénotypique sous l'hypothèse (H1) (existence du QTL à proximité du marqueur considéré) sur la probabilité sous l'hypothèse (H0) (absence de QTL à proximité de ce marqueur).

$$\text{LOD score} = \log((P|H1)/(P|H0))$$

Les marqueurs utilisés lors d'une primo-localisation de QTL sont répartis le long des chromosomes, espacés de plusieurs centimorgans. Ce type d'analyse ne donne aucune information sur ce qui se passe entre les marqueurs. La force de l'association d'un QTL à un marqueur dépend du déséquilibre de liaison qui existe entre le QTL et le marqueur (plus le QTL et le marqueur sont proches, moins ils ségrégent indépendamment). Il est donc possible d'apporter un raffinement mathématique à l'analyse point par point. Brièvement, connaissant

le taux de recombinaison entre deux marqueurs liés à un QTL, il est possible d'estimer le taux de recombinaison dans l'intervalle entre ces deux marqueurs.

Pour chacun de ces points intermédiaires virtuels, il est possible de calculer un LOD score. On obtient alors une courbe de LOD score continue le long du chromosome, et on estime que le QTL est le plus probablement positionné à proximité du point de plus fort LOD score. Cette analyse dite multipoint donne des intervalles de cartographie avec des intervalles de confiance de plusieurs dizaines de centimorgans. Les modèles mathématiques de détection de QTL peuvent intégrer différents paramètres, comme le nombre de QTL en ségrégation dans la population ou encore les relations non-linéaires qui peuvent exister entre les QTL ou entre les QTL et l'environnement.

2. Les modèles murins classiques de détections de QTL

L'apport des souris à la cartographie de QTL est indéniable. Une recherche rapide sur le site internet *Mouse Genome Informatics*³ du laboratoire Jackson permet de trouver plus de 3800 QTL uniquement chez la souris. Ce nombre est rendu possible par l'ensemble des caractéristiques physiologiques et d'élevage de la souris (petit animal prolifique, supportant bien la consanguinité, dont l'environnement peut être standardisé finement), mais aussi par l'existence d'un grand nombre d'outils génétiques qui ont été créés chez la souris. La cartographie de QTL comprend deux étapes : la primo-localisation, qui consiste en un *screening* global du génome afin de détecter des QTL (dans une résolution proche du demi-chromosome) et la cartographie fine, qui permet de définir la région du QTL finement, afin de pouvoir proposer des gènes candidats expliquant la variation phénotypique. Dans un premier temps, je décrirai les outils classiquement utilisés pour cartographier des QTL chez la souris

³ www.informatics.jax.org

(primo-localisation et cartographie fine), puis je présenterai l'outil que j'ai utilisé pour mes travaux : l'ensemble de lignées *Interspecific Recombinant Congenic* (IRCS).

a) Les populations complexes

i *Backcross et intercross*

Les croisements en deux générations, *backcross* ou *intercross*, sont largement utilisés pour cartographier des QTL chez la souris. Le *backcross* (BC) et l'*intercross* (F2) consistent tous deux à créer une population F1 en croisant deux lignées de souris présentant des différences phénotypiques d'intérêt. Les individus en F1 sont hétérozygotes à chaque locus.

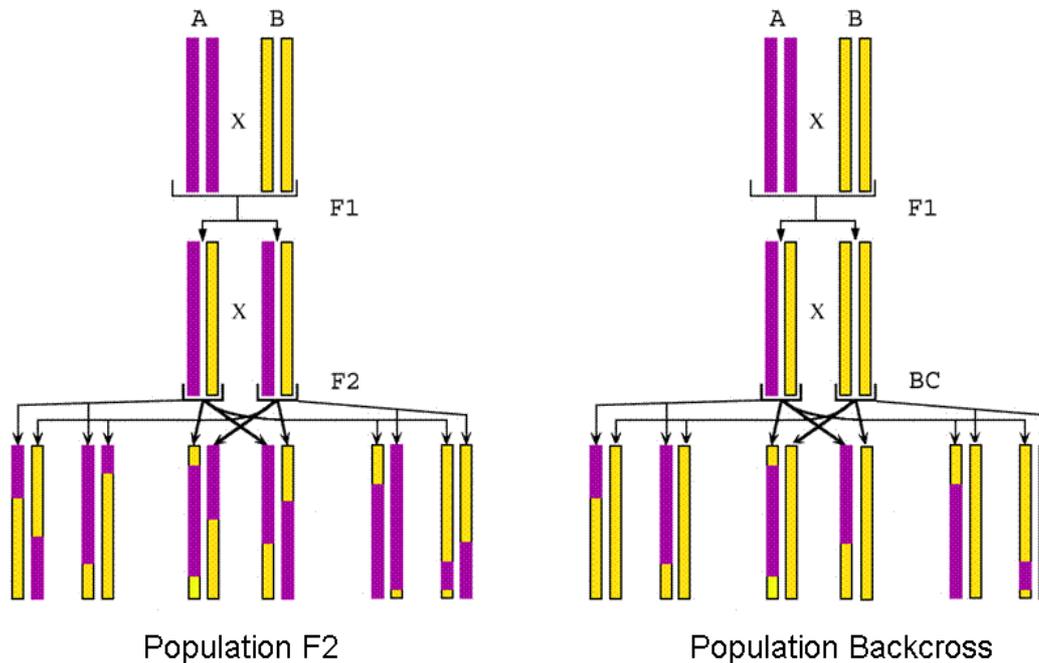


Figure 19 Carte génétique de l'établissement d'une population F2 ou BC.

Une seule paire de chromosome est représentée sur les 19 de la souris.

Dans les deux cas, une population F1, hétérozygote, est constituée par le croisement de deux lignées de souris. Dans l'intercross, les individus F1 sont croisés entre eux, donnant une population F2 comportant tous les génotypes possibles.

Dans le cas du backcross, les individus F1 sont croisés sur la lignée B, la population BC ne comporte pas d'individu homozygote pour des allèles de type A.

Le *backcross* consiste à croiser les individus en F1 avec des individus d'une des lignées parentales, alors que l'*intercross* consiste à croiser les individus F1 entre eux (obtention d'une population F2) (Figure 19).

La différence fondamentale qu'il y a entre BC et F2 est la fréquence des génotypes attendus : pour la population F2, on attend la répartition classique à chaque locus possédant les allèles A pour la lignée parentale 1 et a pour la lignée parentale 2 de :

AA : 25% Aa : 50% aa : 25%

Pour le BC, si on croise la population en F1 avec des individus de la lignée parentale 1, on attend :

AA : 50% Aa : 50% aa : 0%.

Une fois les populations établies, chaque individu est phénotypé et génotypé. Chacun d'eux ayant un génotype unique dans la population, chaque génotype n'est mesurable qu'une seule fois, et est entaché de sa variabilité.

La résolution cartographique attendue pour ce genre d'approche est d'environ 5 à 25 cM si environ 1000 individus sont phénotypés et génotypés (il faut 10 000 individus pour descendre en dessous du cM) [153].

Des outils plus raffinés ont été créés afin de diminuer le nombre d'individus nécessaires ou pour augmenter la puissance de la résolution cartographique des QTL pour un nombre donné d'individus.

Ces outils sont :

- la création de populations plus complexes qu'une F2 ou un BC, afin d'augmenter le nombre de recombinaisons informatives entre les marqueurs et le QTL, ou d'augmenter le nombre de marqueurs polymorphes. Il s'agit des AIL (*advance intercross line*) et des stocks hétérogènes ;

- l'utilisation de l'ensemble (ou une partie) des lignées consanguines déjà établies comme une population générale dans laquelle ségrégent des QTL. Il s'agit de la cartographie d'association.

ii Advance intercross line et stocks hétérogènes

Dans les populations F2 ou BC, le nombre de recombinaisons informatives est limité, puisqu'une seule génération (F1) génère des recombinaisons à l'intérieur des haplotypes parentaux (Sur la figure 19, on peut voir que les fragments génomiques sont assez grands). L'idée des AIL [154] est donc d'augmenter le nombre de recombinaisons à l'intérieur des haplotypes parentaux afin d'augmenter la résolution de la cartographie des QTL. Pour ce faire, les individus en F2 ne sont pas phénotypés, mais à nouveau croisés entre eux, afin de générer une F3, puis une F4... Afin d'augmenter réellement le nombre de recombinaisons intra-haplotypes, les croisements frère-sœurs sont évités pendant l'établissement de la population. A la dernière génération, un croisement consanguin peut être fait. Une AIL à six générations a une résolution comprise entre 5 et 1 cM pour une population de 2500 individus (contre les 10 000 individus d'un croisement en deux générations) [153].

Cette approche permet d'augmenter le nombre de recombinaisons informatives, mais pas le nombre de marqueurs informatifs, ni le nombre de QTL en ségrégation, puisque l'établissement de la population AIL, comme une F2 ou un BC, débute par un croisement entre deux lignées consanguines de laboratoire. Il est possible d'établir une population complexe à partir de croisements impliquant plusieurs lignées (8 par exemple [155]), en première génération, puis de croiser les individus des générations successives afin d'obtenir une population d'individus hautement recombinants, dont le génome est une mosaïque des huit génomes parentaux. Les individus de dernière génération sont génotypés par des

techniques haut-débit, sur un grand nombre de marqueurs. Cette population finale est nommée stock hétérogène. Une telle population a été utilisée par l'équipe de J. Flint. Après un phénotypage extensif (97 phénotypes) d'environ 2500 souris, leurs génotypes sur 13 459 SNP, cette équipe a publié quelques 843 QTL, dans un intervalle cartographique moyen de 2.8 Mpb (certains de ces QTL recouvrent des régions dans lesquelles il y a moins de dix gènes). L'analyse mathématique, qui consiste en une recherche d'association des phénotypes avec les haplotypes ancestraux (cf. chapitre suivant), demande une prise en compte importante de différents biais, rendant l'analyse complexe.

iii Cartographie d'association

L'ensemble des lignées de laboratoire descend d'un nombre restreint de fondateurs communs établis au début du 20ème siècle. Ces lignées, prises dans leur ensemble sont, d'une certaine façon, une population complexe, avec des groupes ayant divergé les uns des autres, portant des polymorphismes communs, hérités par descendance, ainsi que des polymorphismes privés, accumulés pendant les étapes d'isolement des lignées. De la même façon, les souris sauvages constituent une population avec des caractéristiques semblables. Il est donc possible de tester l'association d'haplotypes et de phénotypes entre lignées de laboratoire ou entre souris sauvages afin de cartographier des QTL. Cette technique ne demande pas de croisement, elle met à profit les recombinaisons accumulées pendant l'histoire phylogénétique des lignées. Ce type d'étude permet de localiser des QTL de force importante, sous réserve que différents haplotypes existent dans les différentes lignées testées. De plus, si les QTL sont liés par des relations d'épistasie, ils peuvent ne pas être détectés.

Les études en populations complexes ont souvent l'inconvénient de créer des individus génétiquement uniques, qui ne sont bien souvent phénotypables qu'une seule fois en cas de phénotypages destructifs. Chaque mesure est donc entachée d'une variabilité minimale, même dans un environnement parfaitement standardisé. De ce fait, la puissance statistique de détection des QTL dans de telles populations ne peut augmenter que par l'augmentation de la taille de la population afin de minimiser la variance résiduelle. Une autre possibilité est de stabiliser les génotypes sous la forme de lignées consanguines. Ainsi, un même génotype pourra être étudié plusieurs fois, et donc la valeur phénotypique qui lui sera imputé, sera la plus exacte possible.

b) Les ensembles de lignées

i Construction et exploitations des sets⁴

Il existe trois grands types d'ensembles de lignées de laboratoire utilisés en cartographie de QTL chez la souris :

- Les CSS : *Chromosome Substitution Strains*
- Les RIS : *Recombinant Inbreed Strains*
- Les RCS : *Recombinant Congenic Strains*

Les CSS consistent en des lignées pour lesquelles un chromosome entier (ou presque) est remplacé par son homologue d'une autre lignée. Ces lignées permettent une cartographie avec une résolution d'un chromosome.

⁴ Set : ensemble de lignée, selon la dénomination anglais

Les RIS sont utilisés la première fois en génétique quantitative en 1971 [156]. Depuis, de nombreuses études de génétique mendélienne et de génétique quantitative ont tiré profit de leur existence. La construction d'un set de lignées Recombinant Inbred se déroule comme suit :

- Deux lignées consanguines de souris de laboratoire doivent être choisies, selon des caractéristiques phylogéniques (des lignées plus éloignées ont plus de chance d'avoir accumulé différemment des variations de séquence) et phénotypiques (des différences phénotypiques marquées entre lignées indiquent la présence probable de QTL). Une première étape consiste en la création d'une population F2, dans laquelle les individus ont en moyenne 50% du génome de chaque lignée parentale.
- Ensuite, un certain nombre de croisements frère-sœurs sont établis sur plus de vingt générations afin de fixer chaque locus à l'état homozygote. Les lignées obtenues ont en moyenne 50% du génome de chaque parent (Figure 20).

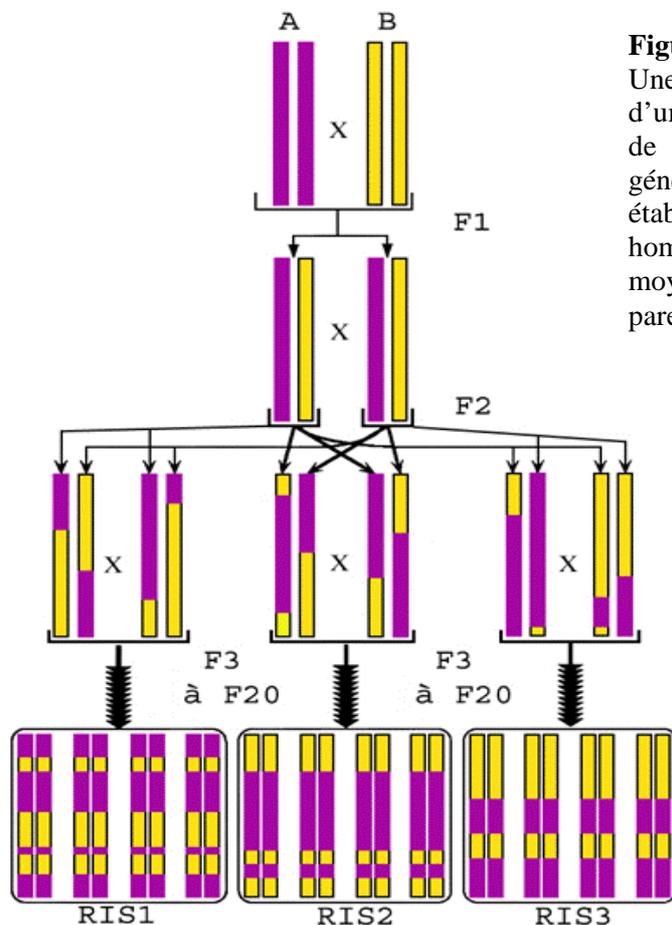


Figure 20 Etablissement du set de RIS

Une première étape consiste en la création d'une population F2 à partir de deux lignées de souris. Ensuite sur plus de vingt générations des croisements frère-sœurs sont établis afin de fixer chaque locus à l'état homozygote. Les lignées RIS possèdent en moyenne 50% du génome des deux lignées parentales

-Le génotypage est conduit une seule fois. En effet, les lignées étant pérennisées, il n'est pas nécessaire de typer les individus phénotypés. Chaque lignée RIS est une combinaison unique du génome de chaque parent, de ce fait, en phénotypant un ensemble de lignée RIS et en comparant leur profil de distribution de leurs haplotypes, on peut déduire le fragment génomique minimal responsable d'une variation phénotypique. Cette analyse porte le nom d'analyse par SDP : *Strain Distribution Pattern*. Les RIS présentent les avantages d'être cumulatives d'un point de vue génotypage et phénotypage.

En effet, toute information acquise sur une RIS est réutilisable puisque la lignée continue d'exister après le phénotypage. Cartographier de nouveaux QTL ne nécessite pas d'étape de génotypage, et enfin, le phénotype pour chaque génotype est mesuré de façon plus fiable, car il y a des répétitions. L'utilisation des RIS présente cependant quelques écueils : la finesse de détection des QTL est fonction du nombre de lignées du set (Darvasi a estimé qu'il faut 40 lignées pour obtenir un intervalle de cartographie de 25 à 5 cM et 500 lignées pour être aux environs du cM). L'ensemble de lignées le plus important actuellement disponible est le set issu du croisement C57BL6* DBA2, qui consiste en une centaine de lignées. Cependant, les lignées C57Bl6 et DBA2 sont des lignées proches, ne présentant pas systématiquement du polymorphisme génétique. L'inconvénient majeur des RIS est de ne pas avoir accumulé suffisamment de recombinaisons informatives, et de ne pas avoir séparé plus systématiquement les locus en interaction. Ces inconvénients peuvent être levés en introduisant deux étapes de backcross avant la mise à l'état consanguin, on obtient alors des RCS : *Recombinant Congenic Strains* (Figure 21).

Le principe des RCS est proposé pour la première fois en 1986 [157]. Le plan de croisement proposé consiste en l'établissement d'une population F1, croisée en retour sur l'une des lignées parentales (lignée dite receveuse). La génération N2 obtenue est croisée sur le même parent, et donne naissance à la population N3.

La mise à l'état consanguin se fait à partir des individus N3 pendant au moins 20 générations. En moyenne, chaque lignée possédera 12.5% du génome donneur dans le fond génétique du génome receveur (Figure 21).

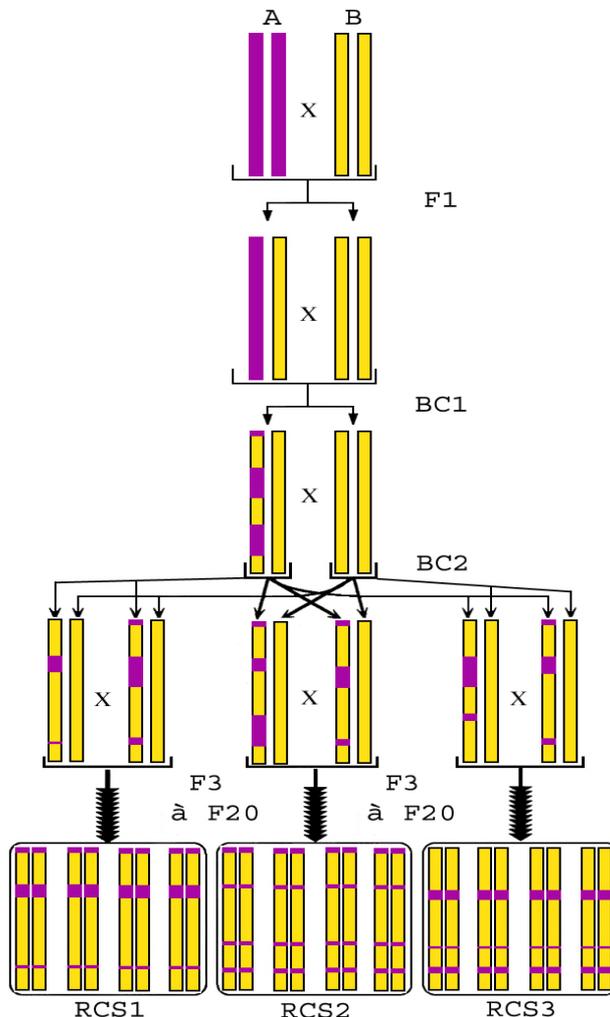


Figure 21 Etablissement du set de RCS

Le plan de croisement consiste en l'établissement d'une population F1, croisée en retour sur l'une des lignées parentales (dite receveuse). La génération N2 est rétro-croisée sur le même parent. La mise à l'état consanguin se fait à partir des individus N3 pendant au moins 20 générations.

Le pourcentage moyen de génome de la lignée donneuse dans les RCS est théoriquement de 12.5 %

On estime qu'il faut 20 lignées pour couvrir l'ensemble du génome (par la lignée donneuse) [157]. Les RCS présentent les mêmes avantages de base que les RIS, mais elles permettent en plus de disséquer les relations d'épistasie entre les QTL. En effet, deux QTL en interaction épistatique ont plus de chances d'être séparés dans au moins deux lignées RCS distinctes que dans deux lignées RIS distinctes. L'estimation théorique de la résolution d'un ensemble de RCS n'est pas évidente : expérimentalement, il semblerait qu'elles puissent se situer entre 5 et 15 Mbp [158].

L'utilisation des RCS et des RIS demande une étape supplémentaire une fois un QTL positionné : la création d'une lignée congénique.

ii L'étude en congéniques

Une fois la primo-localisation de QTL effectuée, la région identifiée doit être introgressée seule dans le fond génétique receveur afin d'en mesurer l'effet, débarrassé de toutes les relations d'épistasie qui peuvent ne pas avoir été détectées. Cette étape est essentielle car toutes les lignées congéniques ne reproduisent pas le phénotype que le QTL semblait contrôler en primo-localisation (par exemple, la lignée congénique portant le QTL *pbwg1* ne reproduit pas la différence de poids corporel observée en primo-localisation [159]). L'intérêt majeur de créer une lignée congénique portant la région QTL est d'effectuer une analyse en sous-congénique pour circonscrire le QTN (*Quantitative Trait Nucleotide*) sous-tendant le QTL. Il s'agit de créer des lignées possédant des fragments de la région d'intérêt, plus ou moins chevauchants. Pour cela, une population F2 est créée à partir de la lignée congénique et de la lignée parentale receveuse, des recombinants de la région sont recherchés par génotypage, et des lignées homozygotes sont établies à partir de ces recombinants (au moins quatre générations sont nécessaires). Une analyse identique à l'analyse par SDP décrite ci-dessus permet de localiser finement le QTL, sur une région ne contenant que quelques dizaines de gènes.

Les lignées RCS et RIS sont établies à partir de lignées classiques de laboratoire. Nous avons vu que ces lignées descendent toutes d'un nombre limité d'ancêtres communs. Le polymorphisme génétique et phénotypique est donc relativement faible entre elles. Ce manque de polymorphisme peut être levé en utilisant des lignées plus éloignées phylogénétiquement.

Le set de lignées RCS présentant le plus de polymorphisme est le set des IRCS, pour lequel le génome donneur appartient à une autre espèce de souris que le génome receveur. Ce sera le modèle utilisé dans le travail de thèse présenté dans ce mémoire.

3. Le modèle IRCS

a) Lignées parentales

L'ensemble de lignées IRC consiste en une série de lignées recombinantes congéniques issues d'un croisement initial entre les lignées C57BL6/J (B6) et SEG/P (SEG). La lignée B6 est une lignée classique de laboratoire, elle est consanguine et est considérée comme appartenant à l'espèce *Mus musculus domesticus*. La lignée SEG est une lignée plus récemment dérivée à partir de souris sauvages de l'espèce *Mus spretus* ; cette lignée est faiblement consanguine.

Les espèces *Mus musculus* et *Mus spretus* ont divergé il y a environ 1.5 milliard d'années, accumulant un polymorphisme génétique estimé à environ 1 à 1.5% (figure 22) [160], ce qui constitue une divergence proche de celle qui existe entre l'homme et le chimpanzé [161].

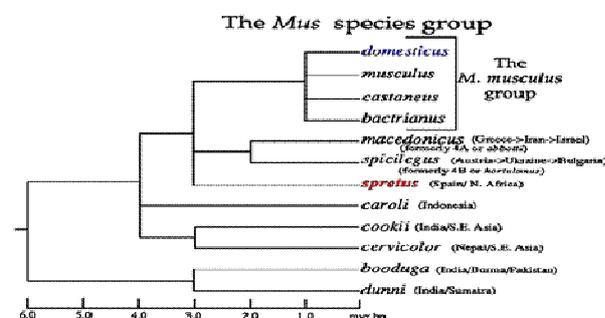


Figure 22 A gauche : Photographie de souris SEG (*Mus spretus*) et C57Bl6 (*Mus musculus*)

A droite : Arbre phylogénétique du genre *Mus*

Les espèces *Mus musculus* et *Mus spretus* ont divergé il y a environ 1.5 milliard d'années.

Arbre extrait de Lee Silver : *Mouse genetics*

Le croisement entre B6 et SEG est possible, même s'il est peu fécond : en utilisant un mâle SEG et une femelle B6, il est possible d'obtenir une portée dont les femelles seront fertiles, mais pas les mâles (selon la règle de Haldane sur la stérilité interspécifique du sexe hétérogamétique [162]). Des locus de stérilité hybride mâle sur le chromosome X ont été décrits (par exemple *Hst3* [163]). Le croisement dans le sens femelle SEG * mâle B6 est décrit comme particulièrement improductif, cette faible fertilité impliquant probablement des défauts de placentation [164].

b) Etablissement du set

L'établissement et la description du set des IRCS a fait l'objet d'une publication [165]. Le croisement initial pour établir le set des IRCS a donc été fait dans le sens M(SEG)*F(B6). Les femelles F1 ont été rétro-croisées sur la lignée B6, donnant naissance à la génération N2. La génération N3 a été obtenue en croisant les mâles N2 fertiles (testés avant utilisation par un test de fertilité, 18 mâles étaient fertiles) avec des femelles B6. A partir de cette étape, environ 4 à 8 couples issus des portées de chacun des 18 mâles N2 ont été établis pour commencer la dérivation de lignées consanguines (soit un total de 118 couples). La dérivation à l'état consanguin des lignées ne s'est pas faite sans perte : sur les 118 lignées, 63 se sont éteintes dès les premiers croisements consanguins. Actuellement 55 lignées IRCS sont maintenues à l'Institut Pasteur de Paris. La nomenclature est : BcG suivi du numéro du mâle fondateur N2 puis d'une lettre, par exemple BcG-97C, nommée par la suite 97C pour des raisons de commodité.

c) Génotypage des lignées

Après au moins 20 générations de croisements consanguins, les lignées IRCS ont été génotypées une première fois sur un ensemble de 183 microsatellites, en utilisant un pool d'ADN génomique issu de l'ensemble des reproducteurs de chaque lignée. Un second génotypage sur 490 SNP, en collaboration avec le Centre National de Génotypage (CNG) d'Evry a été effectué, offrant une couverture totale du génome des lignées avec 673 marqueurs.

d) Description du set des IRCS

Les ensembles de RCS établis à partir de lignées classiques de laboratoire répondent bien aux attentes théoriques (voir par exemple le set Acb/bcA [166]) : en moyenne, on retrouve approximativement 12.5% du génome donneur par lignée, et une vingtaine de lignées couvre plus de 90% du génome. En revanche, le set des IRCS montre des écarts très significatifs par rapport au modèle théorique : la moyenne du pourcentage de génome *spretus* introgressé dans le fond *musculus* est de 1.37% (0 à 3.8%) par lignée, et le pourcentage cumulé sur les 55 lignées n'atteint que 39.7%. Pour le set d'IRCS, le pourcentage théorique attendu était de 8.3%, car des backcross supplémentaires ont été nécessaires pour sauver certaines lignées au bord de l'extinction. Ces faibles pourcentages peuvent trouver leur explication dans la forte perte de lignées lors des premières étapes de mise à l'état consanguin. En effet, même s'il est classiquement décrit une certaine extinction de lignées pendant la mise à l'état consanguin, les pertes subies par le set des IRCS sont quantitativement plus importantes, montrant une forte contre-sélection des allèles *spretus*.

Au final, la couverture du génome est inégale, avec deux chromosomes couverts à 90% (MMU18 et 19), une majorité des chromosomes couverts entre 28 et 73 %, et enfin, quelques chromosomes faiblement couverts (MMU5, MMU8 et MM9 à moins de 12%) ou non couverts (X et Y) (Figure 23). Les lignées possèdent entre 1 et 8 fragments *spretus* détectés, avec une moyenne d'environ 3 fragments par lignée. Huit lignées ne possèdent qu'un seul fragment *spretus*, elles sont équivalentes à des lignées congéniques. La taille moyenne des fragments est de 11 Mb, similaire à ce qui peut être observé dans les outils RCS classiques. Le faible pourcentage de génome *spretus* par lignée IRCS, comparé à une lignée RCS, est donc lié à un nombre plus faible de fragments maintenus, mais leur taille n'est pas inférieure en moyenne (le nombre d'événements de recombinaison intra-fragment doit être sensiblement le même).

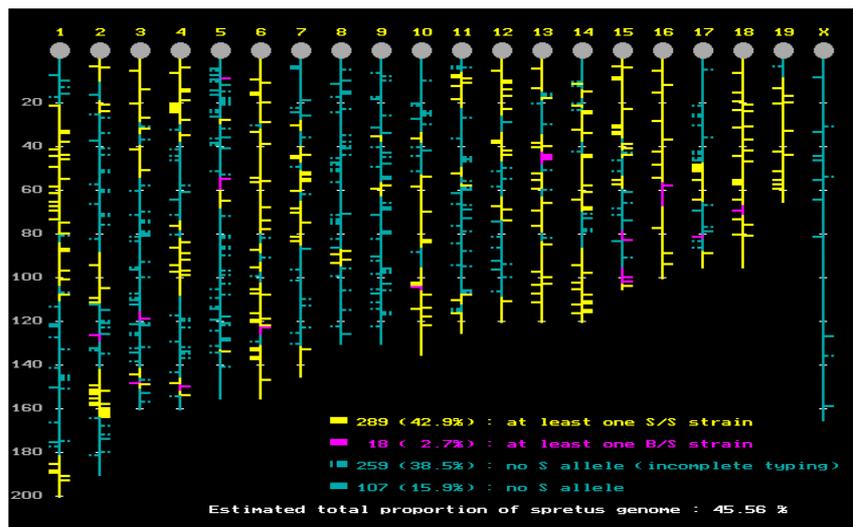


Figure 23 Carte composite de l'ensemble des génotypes des IRCS

Les parties du génome sous forme *spretus* dans au moins une lignée IRCS sont représentées en jaune à l'état homozygote, en rose à l'état hétérozygote. Les parties du génome qui sont musculus dans toutes les IRCS sont représentées en bleu.

4. Application de la cartographie des QTL à la fertilité, un caractère complexe

a) Complexité phénotypique et aspect quantitatif

Comme nous avons pu le voir en première partie de l'introduction, le potentiel de fertilité d'un individu mâle se construit au cours d'un grand nombre d'étapes, intégrant des processus complexes et multiples. Ces processus font intervenir un grand nombre de gènes, interagissant entre eux, et de nombreuses régulations de différents types (endocrine, paracrine ou juxtacrine). De plus, la notion de population cellulaire prend une grande importance quand on parle de fertilité mâle. En effet, le nombre de spermatozoïdes produits, et éjaculés est un premier facteur de fertilité. D'après l'organisation mondiale de la santé, pour qu'un homme soit fertile, on estime que le nombre de spermatozoïdes dans éjaculat doit être supérieur à 20 millions par mL, que la population des spermatozoïdes morphologiquement normaux dans le sperme doit être d'au moins 30% et le pourcentage de gamètes mobiles une heure après éjaculation d'au moins 50%. En dessous de ces seuils, l'individu est hypofertile. Parmi la population fertile, on retrouve des hommes avec des paramètres de qualité et de quantité de spermatozoïdes très variables. Cette variabilité phénotypique, ainsi que le polygénisme intervenant dans la régulation des sous-phénotypes (morphologie, production, capacitation, mobilité...) de la fertilité, justifie le fait que des études de génétique quantitative soient conduites sur des paramètres de la fertilité mâle.

b) Etudes de génétique quantitative de la fertilité mâle, état du sujet

i Apport des souris

Environ 3800 QTL sont cartographiés chez la souris, dont 57 concernent des phénotypes de la sphère reproductrice mâle. Ces QTL, en dehors de ceux détectés dans l'étude présentée dans l'article 1 dans ce mémoire, sont résumés dans le tableau 1.

Concernant le phénotype de stérilité mâle, on distingue deux types d'étude : la première s'intéresse à une stérilité mâle associée à l'obésité dans un modèle déficient pour la leptine [167] ; le second type d'étude s'intéresse à la stérilité hybride mâle. En effet, le croisement interspécifique ou inter-sub-spécifique, selon la règle d'Haldane, produit des individus mâles stériles ou fortement hypofertiles. Plusieurs locus de stérilité hybride ont été positionnés sur le chromosome X à partir de différents types de croisements inter-sub-spécifiques [168-171]. Par exemple, Oka et collaborateurs en 2004 ont introgressé le chromosome X issu de *Mus musculus molossinus* (MSM/MS) dans un fond génétique B6 (création d'une lignée congénique $X^{\text{MSM/MS}}$). Cette introgression a conduit à une hypofertilité mâle que les auteurs ont disséquée en un QTL de réduction de poids testiculaire, et trois QTL d'anomalie de la morphologie du noyau. Ces mêmes auteurs ont découvert des locus autosomiques interagissant avec les QTL d'anomalies nucléaires en réintroduisant des fragments de chromosomes autosomiques de MSM/MS dans la lignée congénique $X^{\text{MSM/MS}}$, ces nouveaux QTL restaurent en partie la fertilité mâle [171]. Cette étude constitue un très bel exemple de dissection d'une relation d'épistasie régulant la fertilité mâle.

L'équipe de Good en 2008 s'est penchée sur le problème de la stérilité hybride, en introgressant réciproquement des fragments du chromosome X *M. m. musculus* et *M. m. domesticus* d'individus issus de lignées établies à partir de souris sauvages (les études

précédentes avaient utilisé des lignées de laboratoire). Cette étude a montré l'existence de nombreux locus de stérilité sur le chromosome X *musculus*, impliquant des réductions de poids testiculaire, des diminutions de la production de gamètes, et des anomalies spermatiques. Si l'on considère l'ensemble des études ayant cartographié des QTL de stérilité mâle sur le chromosome X, certains QTL se chevauchent, indiquant l'existence dans ces régions de gènes importants contrôlant la fonction testiculaire, et qui sont probablement impliqués dans l'isolement reproductif.

Les autres études de génétique quantitative de la fertilité mâle ont utilisé différents outils de cartographie de QTL :

- Aniela Golas [172] a utilisé un set de 12 lignées RIS issues du croisement des lignées consanguines KE et CBA. La lignée KE a été décrite en 1972 comme présentant un fort pourcentage d'anomalies de la morphologie des spermatozoïdes [173]. Des QTL de morphologie de la tête des spermatozoïdes ainsi que des QTL impliqués dans la résistance des spermatozoïdes au choc osmotique ont été positionnés.

- L'équipe d'Isabelle Le Roy [174] a utilisé une population F2 obtenue à partir du croisement de deux lignées classiques de laboratoire C57BL/6By et NZB/BINJ présentant des différences importantes du poids des testicules et des vésicules séminales. Des QTL de ces deux paramètres ont été cartographiés.

- L'équipe de Hasbaira Bolor [175] a recherché des locus impliqués dans un phénotype d'arrêt méiotique retrouvé dans le mutant stérile *smt* (small testis [176]). Pour ce faire, un intercross a été établi à partir de femelles *Smt* et de mâles de la lignée MOM (*M. m. molossinus*). Des QTL de poids testiculaire et de défauts de spermatogenèse (arrêts méiotiques à différents stades, dégénérescence de l'épithélium séminifère) ont été positionnés.

- Jun-ichi Suto en 2008 [177] a étudié l'influence du chromosome Y sur le poids testiculaire et a recherché de nouveaux QTL autosomiques contrôlant ce paramètre. Pour le chromosome

Y, Suto a établi un set de lignées consomiques du chromosome Y issues de 15 lignées de laboratoire, en introgressant ce chromosome dans le fond génétique de la lignée DH/sgn. L'auteur conclut que le chromosome Y a une implication modeste dans le déterminisme du poids testiculaire. Afin de positionner des QTL autosomiques, Suto a réalisé une population F2 entre les lignées DDD/sgn (à fort poids testiculaire) et la lignée DH/sgn (dont le poids testiculaire est moyen). Trois QTL influençant le poids testiculaire absolu ou relatif au poids du corps ont été cartographiés. Suto conclut que dans son modèle, l'effet des QTL autosomiques sur le poids testiculaire est plus important que l'effet du chromosome Y.

De cet ensemble de QTL de fertilité mâle, de nombreux gènes candidats ont été proposés, cependant, le clonage positionnel non-ambigu du gène responsable n'a été conduit jusqu'à son terme, pour aucun d'entre eux.

Tableau 1 Résumé des QTL de fertilité mâle, découverts dans des modèles souris
 Modifié à partir de *Laissue et al. 2008* [5]

Name	Phenotype	QTL mapping	Population design	Bibliography
Hom1	increased circulating testosterone level decreased seminal gland weight increased testis weight	MMU17 (-19 cM)	A/Ph x B10.A-H2<a>F2	Ivanyi P <i>et al.</i> Nat New Biol 1972
Mors1	decreased sterility in obese male animals	MMU1 (101.5 cM - 106.3 cM)	(C57BL/6J-Lep<ob>/Lep<ob> x BALB/c)F2	Ewart-Toland A <i>et al.</i> Endocrinology 1999
Mors2	decreased sterility in obese male animals	MMU3 (52.5 cM - 71.8 cM)		
Tesw1	increase in testis weight	MMUX (-37.8 cM)	(C57BL/6By x NZB/BINJ)F2	Le Roy I <i>et al.</i> Genetics 2001
Tesw2	increase in testis weight	MMU10 (-57 cM)		
Tsw1	increased testis; seminal vesicles weight	MMU4 (-47.5 cM)		
Hstx1	abnormal testes histology, reduced testis weight; abnormal sperm head morphology	MMUX (-29.5 cM)	Interspecific consomic C57BL/6J- Chr X<PWD/Ph>	Storchova R <i>et al.</i> Mamm Genome 2004
Mhstq1	reduced testes weight; abnormal sperm heads, no sperm tails	MMU17: (-16 cM)	(C57BL/6J x M. macedonius)F1 x C57BL/10J backcross =>MMU17 congenic strain	Elliott RW <i>et al.</i> Mamm Genome 2004
Mhstq2	reduced testes weight; most males do not produce sperm heads, in rare cases abnormal sperm heads are present	MMUX (-17 cM)	(C57BL/6J x M. macedonius)F1 x C57BL/10J backcross =>MMUX congenic strain	
Tesq1	deceased testis weight	MMU13 (-10 cM)	(M16i x L6)F2	Rocha JL <i>et al.</i> Mamm Genome 2004
Tesq1	deceased testis weight	MMU6 (-44,9 cM)		
Tesq1	increased testis weight	MMU10 (-69 cM)		
Spha1	abnormal sperm head morphology	MMUX (8.8 cM)	consomic (C57BL/6J-X<MSM>)	Oka A <i>et al.</i> Genetics 2004
Spha2	abnormal sperm head morphology	MMUX (14.1 cM - 33.5 cM)		
Spha3	abnormal sperm head morphology	MMUX (43 cM - 70.5 cM)		
Tsw1	deceased testis weight	MMUX (58 cM - 63 cM)		
Smtw1	deceased testis weight	MMU4 (- 61,6 cM)	(Smt x Mus musculus molossinus)F2	Bolor H <i>et al.</i> Exp Anim 2006
Smtw2	deceased testis weight	MMUX (- 59 cM)		
Spmd1	increased meiotic defect; multinuclear giant cells	MMU4 (- 39,5 cM)		
Spmd2	increased meiotic defect; increased germ cell degeneration	MMU4 (- 25,8 cM)		
Spmd3	increased germ cell degeneration	MMU7 (-22 cM)	MMU13 (epistatic with spmd2)	
Spmd4	increased germ cell degeneration	MMU13 (epistatic with spmd2)		
Ilx1	partially restore fertility induce by Spha QTLs	MMU1 (D1MIT49 - D1MIT288)	consomic (C57BL/6J-MSM)	Oka A <i>et al.</i> Genetics 2007
Ilx2	partially restore fertility induce by Spha QTLs	MMU11 (D11MIT52 - D11MIT69)		
Ilx3	partially restore fertility induce by Spha QTLs	MMU11 (D11MIT71 - D11MIT236)		
	abnormal sperm head morphology	MMU11-(D11MIT242)	Recombinant inbred KE x CBA	Golas <i>et al.</i> Int. J. Dev. Biol. 2008
	abnormal sperm head morphology	MMU13-(D13MIT3)		
	abnormal sperm head morphology	MMU6-(D6MIT268)		
	abnormal sperm head morphology	MMU8-(D8MIT289)		
	abnormal sperm head morphology	MMU1-(D1MIT452)		
	sperms without cytoplasmic droplet	MMU1-(D1MIT215)		
	sperms without cytoplasmic droplet	MMU11-(D11MIT130)		
	sperms without cytoplasmic droplet	MMU15-(D15MIT252)		
	sperms with broken tails	MMU11-(D11MIT48)		
	sperms with broken tails	MMU7-(D7MIT37)		
	sperms with straight tails	MMU13-(D13MIT147)		
	sperms with straight tails	MMU1-(D1MIT296)		
	sperms with straight tails	MMU6-(D6MIT102)		
	sperms with straight tails	MMU11-(D11MIT79)		
	sperms with straight tails	MMU11-(D11MIT151)		
Abshq1	abnormal sperm head morphology	MMUX (-2,5 cM)	congenics (M. m. domesticus-X<musculus>)	Good <i>et al.</i> Genetics 2008
Abshq2	abnormal sperm head morphology	MMUX (-10,3 cM)		
Abshq3	abnormal sperm head morphology	MMUX (-19 cM)		
Abshq4	abnormal sperm head morphology	MMUX (-25,5 cM)		
Abshq5	abnormal sperm head morphology	MMUX (-42,7 cM)		
Abshq6	abnormal sperm head morphology	MMUX (-49 cM)		
Abshq7	abnormal sperm head morphology	MMUX (-73,3 cM)		
Lspc1	low sperm count	MMUX (-15,1 cM)	congenics (M. m. musculus-X<domesticus>)	
Lspc2	low sperm count	MMUX (-67cM)		
Rtwq1	reduced testis weight	MMUX (-13,3 cM)		
Rtwq2	reduced testis weight	MMUX (-24 cM)		
Rtwq3	reduced testis weight	MMUX (-59,5 cM)		
	testis weight	MMUX (-37 cM)		
	testis weight	MMUX (-61 cM)		
Twdq1	Increased testis weight	MMU9 (-24 cM)	(DDD/Sgn x DH/Sgn)F2	Suto Proc. Jpn. Acad. 2008
Rtwdq1	Increased testis weight	MMU14 (-52 cM)		
Rtwdq2	Increased testis weight	MMU17 (-7 cM)		

ii Modèles mammifères non murins

Des modèles de mammifères non murins ont permis de cartographier des QTL de fertilité mâle. Un seul exemple de QTL d'infertilité mâle existe chez le rat [178], alors que de très nombreux outils génétiques existent et que le génome du Rat est relativement bien connu. Les espèces domestiques de production animale ont été aussi utilisées, la fertilité apparaissant comme un paramètre clef en matière de production animale, et une péjoration des paramètres de la fertilité a été observée dans les espèces animales d'élevage (par exemple pour les vaches laitières [179, 180]). Des QTL de fertilité mâle ont été recherchés et cartographiés chez le porc, le mouton, et le taureau. Les populations utilisées peuvent être des populations F2, comme pour la souris, ou des populations plus complexes, chez les bovins notamment. La filière de l'élevage bovin en France est très organisée, en particulier dans le contexte de l'élevage laitier, pour lequel le *pedigree* des animaux, ainsi que leur génotype et leur phénotype sont connus et centralisés. Des études d'association tenant compte de la structure familiale peuvent être conduites pour cartographier des QTL.

Chez le porc, plusieurs études de génétique multifactorielle sur la fertilité ont été menées (voir la base de données *Pig-QTL database*⁵). Les phénotypes étudiés sont :

- la qualité du sperme sur une population F2 Duroc×Erhualian [181],
- le poids testiculaire sur une population F2 Duroc×Meishan [182],
- le niveau sanguin de FSH dans une population F3 issue d'un croisement original Meishan (ME)×White Composite (WC) (individus issus du croisement de trois races différentes) [183].

⁵ <http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>

Pour l'un des QTL positionné sur le chromosome X porcin (SSC X), un gène candidat a été étudié : le gène de la *Thyroxine-Binding Globuline*, qui présente un polymorphisme de séquence (SNP non synonyme) entre Meishan et White Composite : le variant de l'enzyme WC a une meilleure affinité pour son substrat T4 que celui de ME. L'implication de ce polymorphisme dans le phénotype n'est pas prouvée, la cartographie fine du QTL sur SSC X n'étant pas possible car la carte génétique n'est pas suffisamment dense.

Peu d'études de QTL de fertilité chez les ruminants (Bovin et ovin) ont été conduites. Une étude a recherché des QTL régulant le taux de FSH circulant, le poids et le volume testiculaire, ainsi que l'âge de la puberté, dans une population BC établie par le croisement inter-sub-spécifique *Bos indicus* × *Bos taurus*. Une étude non publiée, conduite en collaboration entre l'INRA et l'UNCEIA (Union Nationale des Coopératives d'Elevage et d'Insémination Animale), faisant partie du projet AGENAE (Analyse du GENome des Animaux d'Elevage), a positionné des QTL impliqués dans la production et la qualité du sperme ainsi que dans le taux de réussite à l'insémination artificielle, en utilisant les données de 10 familles de 515 taureaux en race Holstein (rapport d'activité 2005 sur le site de l'UNCEIA).

Pour les ovins, la base de données *Sheep QTL database*⁶ ne référence qu'une étude recherchant des QTL influençant le poids testiculaire en utilisant un croisement en BC (ITT x Mérinos F1) x Mérinos [184] (non référencée par pubmed). Huit QTL autosomiques ont été positionnés.

La recherche de QTL dans les modèles non murins est souvent rendue difficile par plusieurs facteurs :

- les outils génétiques disponibles chez la souris ne le sont pas toujours aisément pour les espèces d'élevage,

⁶ <http://sphinx.vet.unimelb.edu.au/QTLdb/>

- le temps de génération est plus long (il apparaît difficile d'établir un ensemble de lignées RCS ou RIS chez le porc ou le bovin).
- les génomes de ces espèces ne sont pas encore complètement séquencés, le nombre de marqueurs peut être parfois insuffisant pour effectuer une cartographie fine. La séquence de ces génomes devrait toutefois être rapidement disponible.

Des ressources pour la cartographie de QTL sont encore largement sous-exploitées : le chien et le chat par exemple, pour lesquels il existe un réservoir de polymorphismes exceptionnel en raison de l'existence de très nombreuses races (Pour l'espèce *Canis canis*, le classement F.C.I. (Fédération Cynologique Internationale⁷) reconnaît 330 races par exemple). Le génome de ces espèces est séquencé, avec toutefois une profondeur bien moindre que celle des génomes de l'homme ou de la souris. Ces sources de variations phénotypiques et génotypiques sont de véritables réservoirs de QTL en ségrégation, et notamment de QTL de fertilité.

⁷ <http://www.fci.be>

C. **Présentation du travail de thèse**

L'objectif de ma thèse était de trouver de nouveaux locus impliqués dans la régulation des paramètres de la fertilité mâle en utilisant l'outil IRCS. Lors de mes travaux de Master, j'ai défini l'ensemble des paramètres que nous souhaitions étudier et j'ai commencé le travail de phénotypage de 53 lignées IRCS et des deux lignées parentales. Au début de ma thèse (la première année), j'ai terminé le phénotypage des paramètres de fertilité mâle sur l'ensemble du set des IRCS. Ce travail de primo-localisation fait l'objet de la première publication présentée.

Article 1 :

Centimorgan-range one-step mapping of fertility traits using interspecific recombinant congenic mice.

L'Hôte D, Serres C, Laissue P, Oulmouden A, Rogel-Gaillard C, Montagnetelli X, Vaiman D. *Genetics*. 2007 Jul;176(3):1907-21.

Parmi les lignées présentant un phénotype intéressant, j'ai choisi deux lignées présentant des phénotypes extrêmes, respectivement un faible poids testiculaire et une forte fréquence d'anomalie de la morphologie de la tête des spermatozoïdes. Sur ces lignées, un travail de cartographie fine a été entrepris : j'ai construit des lignées congéniques portant chacune un seul des différents fragments *spretus*, puis dans un cas, j'ai construit un ensemble de lignées sous-congéniques afin de réduire la taille du fragment causal. En parallèle, j'ai essayé de caractériser les phénotypes des lignées, d'un point de vue physiologique et moléculaire. Dans un cas, j'ai pu proposer une région contenant dix gènes potentiellement impliqués dans une réduction du poids testiculaire et une tératozoospermie (travaux non publiés).

Afin de mieux comprendre les phénotypes des lignées choisies et de proposer des gènes candidats, nous avons effectué une analyse du transcriptome testiculaire. De cette analyse, nous avons déduit des informations intéressantes sur le comportement transcriptionnel des gènes dans un contexte de génome mosaïque interspécifique. Ces conclusions font l'objet de la seconde publication présentée dans ce mémoire.

Article 2:

Gene expression regulation in the context of mouse interspecific mosaic genomes.

L'Hôte D, Serres C, P, Oulmouden A, Montagutelli X, Veitia R, Vaiman D.

Genome Biol. 2008;9(8):R133. Epub 2008 Aug 27

Enfin, pendant ma thèse, j'ai pu, d'une part participer à des travaux de réflexion dans des articles de revue, et d'autre part, j'ai pu établir des collaborations fructueuses avec d'autres équipes de recherche travaillant sur des problématiques de fertilité. Ces travaux sont présentés très brièvement en annexe en fin de mémoire.

II. Résultats

A. Recherche de QTL de fertilité mâle

I. Primo-localisation de QTL impliqués dans la modulation de paramètres de la fertilité mâle dans le modèle murin IRCS

a) Introduction et principaux résultats de l'article 1

i Phénotypes mesurés

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, la fertilité est un caractère phénotypique dont la génétique est complexe. Le caractère de fertilité doit être considéré comme un ensemble de sous-phénotypes mesurables. Souhaitant trouver de nouveaux QTL de fertilité mâle en utilisant le set de lignées IRCS, nous avons défini un ensemble de paramètres à étudier caractérisant la fertilité mâle de chacune des lignées IRCS. Nous avons fait le choix de paramètres dont la mesure est simple et rapide. Nous avons étudié des mâles de 8 à 9 semaines, pour lesquels la sphère reproductrice est mature.

Sur chaque mâle, nous avons mesuré :

- Le poids des organes reproducteurs (testicules, épидидymes, vésicules séminales et prostate), reflétant l'imprégnation hormonale. Pour quelques mâles de chaque lignée, une analyse histologique du testicule et des glandes annexes a été conduite.

- La production des gamètes par la mesure de la réserve spermatique épидидymaire totale.

- Nous avons aussi mesuré des paramètres liés à la qualité des spermatozoïdes :
- La morphologie des spermatozoïdes épидидymaires.
- Le mouvement des spermatozoïdes épидидymaires, en utilisant un système d'analyse semi automatique (CASA).
- Leur aptitude à effectuer la réaction acrosomique, après induction avec un ionophore calcique. Le statut de l'acrosome a été analysé en utilisant la cytométrie de flux après coloration de l'acrosome par la PNA-FITC.
- Leur vitalité, précoce (après 15 minutes de diffusion dans un milieu non capacitant) et tardive (après 2 heures dans un milieu capacitant).

ii Résultats sur les lignées

Pour chaque lignée IRCS, la moyenne de chaque paramètre a été comparée à celle de la lignée contrôle B6. Comme la lignée B6 a servi de lignée de référence pour l'ensemble des 53 lignées IRCS, une correction statistique pour les tests multiples avec groupe témoin unique a été appliquée (correction de Dunnett). L'ensemble des lignées présentant une déviation phénotypique significative pour chaque paramètre par rapport à B6 est donné dans l'article 1.

Nous avons pu observer que la distribution des phénotypes des lignées IRCS n'était pas toujours comprise entre les valeurs parentales B6 et SEG. Par exemple, pour le poids testiculaire, compris entre environ 170 mg (poids des deux testicules d'un mâle B6) et 260 mg (SEG), quatre lignées IRCS présentent des poids testiculaires significativement inférieurs à celui de B6 (jusqu'à -30 % pour la lignée 97C). De la même façon, alors qu'environ 6% des spermatozoïdes de B6 et 1% de ceux de SEG, présentent des anomalies de forme du noyau, plus de 20 lignées IRCS ont un pourcentage d'anomalies spermatiques supérieur à B6 (allant jusqu'à 50% pour la lignée 44H) (figure 24).

Ces deux observations suggèrent que les phénotypes observables dans les IRCS pourraient être dus à des incompatibilités moléculaires entre les fragments *spretus* et le fond génétique B6, autrement dit, des ruptures d'épistasies.

Nous avons pu trouver des lignées présentant des déviations phénotypiques significatives par rapport à la lignée B6 pour la quasi-totalité des phénotypes mesurés. Cependant, il ne s'est pas toujours avéré possible de positionner des QTL directement. En effet, le génome des lignées présentant des déviations phénotypiques significatives porte souvent plusieurs fragments *spretus*.

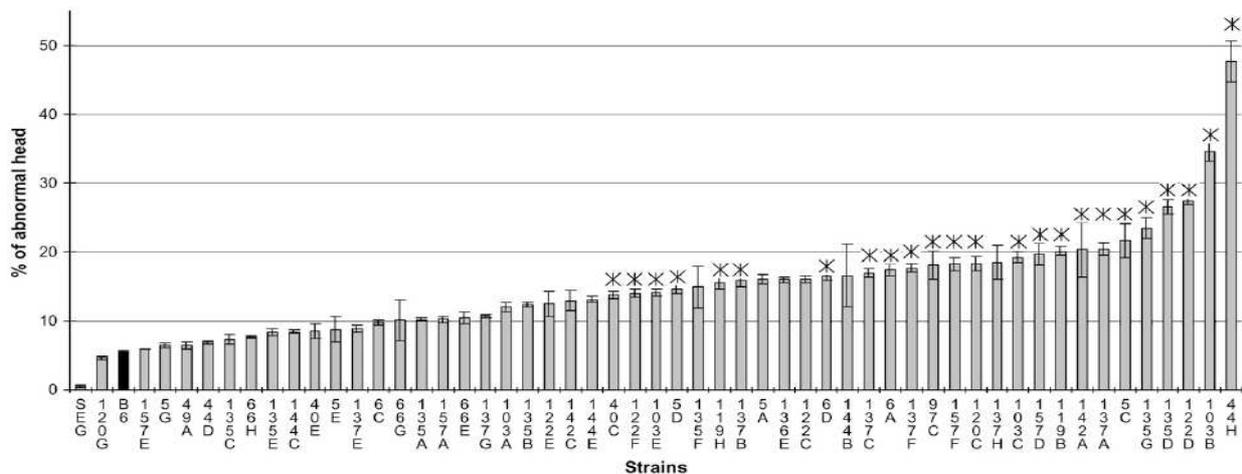


Figure 24 Fréquence des anomalies affectant le noyau des spermatozoïdes dans les lignées IRCS et parentales en valeurs moyennes (\pm SEM).

La lignée SEG présente 1% d'anomalies, la lignée B6 environ 6%, 24 lignées IRCS ont significativement plus d'anomalies spermatiques que B6.

Extrait de *L'hôte et al. 2007*

b) Discussion et Conclusion de l'article 1

Comme nous l'avons vu en introduction, la cartographie de QTL en utilisant un outil RCS classique fait appel à l'analyse en *Strain Distribution Pattern* : la comparaison des données phénotypiques ne se fait plus entre une lignée RCS et la lignée contrôle, mais, pour chaque locus, entre les individus (toutes lignées confondues) qui présentent le variant allélique issu du génome donneur et les individus qui possèdent le variant allélique du génome receveur au même locus. Cette analyse pose le principe que si deux lignées portent, entre autres, une partie du même fragment génomique, et montrent la même déviation phénotypique, alors la présence de la partie commune du fragment peut être statistiquement liée à la déviation phénotypique. Ainsi, cette analyse permet de passer de données phénotypiques recueillies sur des lignées, à des données concernant des locus (QTL), et même de réduire la taille du QTL.

Cependant, pour que cette analyse soit conduite sans biais, il faut pouvoir faire l'hypothèse que la majeure partie des QTL a un comportement purement additif. Si la valeur phénotypique de la lignée résulte d'une relation d'épistasie entre les fragments qu'elle porte, alors l'analyse par *Strain Distribution Pattern* n'est possible que si le plan statistique représenté par l'ensemble des fragments génomiques introgressés est parfaitement équilibré. En effet, pour détecter les effets d'épistasie, il faut que les fragments en interaction soient aussi portés séparément par d'autres lignées afin de juger de leur effet propre. Par exemple, si une lignée possède les fragments (a), (b) et (c) et que le fragment (a) n'est porté que par cette lignée, et que le QTL n'est détectable que quand les fragments (b) et (c) sont réunis, une analyse par SDP imputera l'effet au fragment (a) de façon erronée (Figure 25).

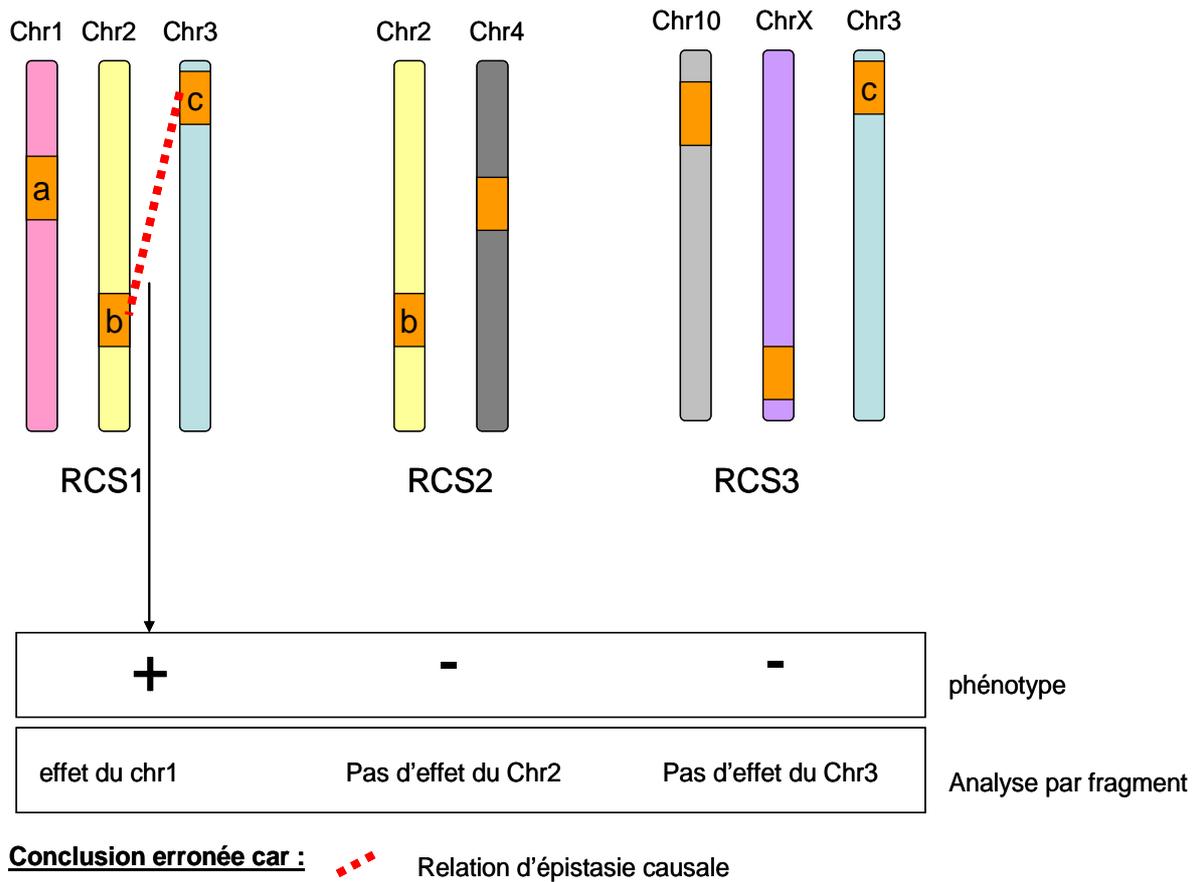


Figure 25 Exemple d'une analyse par SDP, erronée, dans le cas d'un QTL épistatique dans un plan statistique déséquilibré.

Dans le cas des IRCS, il est vraisemblable que les QTL sous-tendant les déviations phénotypiques soient probablement de nature épistatique, dans la mesure où les effets phénotypiques sont le reflet d'interactions inadéquates entre fractions du génome (protéines-protéines ou protéines-ADN). D'autre part, le pourcentage de génome *spretus* par lignée étant de moins de 4%, la redondance de couverture du génome est faible. Les fragments *spretus* ne sont souvent portés que par une seule lignée. **Dans l'outil IRCS dont nous disposons, les effets fragments sont confondus avec les effets lignées, l'analyse par SDP n'est donc pas possible.**

Afin de positionner des QTL dès la primo-localisation, nous nous sommes servis des 8 lignées IRCS qui ne présentent qu'un seul fragment *spretus* détecté. Ces lignées ont permis d'ancrer des QTL de fertilité mâle (avec la couverture du génome de 600 marqueurs, la probabilité de l'existence d'un fragment caché supplémentaire pour l'une des lignées est relativement faible). Lorsque d'autres lignées portaient une partie du fragment et montraient une déviation phénotypique identique, nous les avons utilisées pour affiner la position des QTL. Nous avons pu proposer 8 QTL, résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 QTL de fertilité mâle cartographiés dans l'outil IRCS L'Hôte et al. 2007

Name	Phenotype	QTL mapping	Candidate Gene
Dss1	decreased sperm survival	MMU6 (137.4 Mb - 149.5 Mb)	
Hpw1	high prostate weight	MMU19 (43 Mb and the telomere)	Mxi1
Sh1	QTLs affecting sperm head shape	MMU6 (137 Mb - 146 Mb).	Capza3 Tuba3b
Sh2	QTLs affecting sperm head shape	MMU3 (144.17 Mb - 146.94 Mb)	Spata1
Sh3	QTLs affecting sperm head shape	MMU12 (106.3 Mb - 120.5 Mb)	
Sh4	QTLs affecting sperm head shape	MMU11(3.5 Mb - 26.5 Mb)	
Ltw1	deceased testis weight	MMU11 (3.5 Mb - 26.5 Mb)	
Ltw2	deceased testis weight	MMU6 (133.3 Mb - 149.5 Mb)	

L'utilisation du modèle IRCS nous a permis d'effectuer une primo-localisation rapide de 8 nouveaux QTL de fertilité mâle. Les déviations phénotypiques que nous avons pu observer sont quantitativement importantes : en effet, des lignées présentent des réductions de poids testiculaire allant jusqu'à 30% ou des augmentations de la fréquence des anomalies morphologiques spermatiques de plus de 5 fois par rapport à la lignée B6. Or d'après J. Flint, la valeur de la déviation phénotypique est l'un des paramètres principaux pour réussir le clonage positionnel du gène responsable du QTL. En effet, les rares clonages positionnels actuellement publiés n'ont été possibles que dans les cas où les QTL expliquaient une part substantielle de la variation phénotypique [185].

c) Article 1

*Centimorgan-range one-step mapping of fertility traits
using interspecific recombinant congenic mice.*

2. Cartographie fine des QTL de poids testiculaire et de morphologie des spermatozoïdes

a) Introduction

Dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la régulation des paramètres de la fertilité mâle, nous avons choisi d'effectuer l'étude en cartographie fine de QTL sur deux lignées IRCS qui présentaient des phénotypes extrêmes et à pénétrance complète. Nous avons choisi d'étudier la lignée 44H, présentant le plus fort pourcentage de tératozoospermie (~50 % d'anomalies) à l'exclusion de tout autre phénotype. Cette lignée porte 8 fragments *spretus* détectés. L'autre lignée que nous avons choisi d'étudier est la lignée 97C, présentant le plus faible poids testiculaire parmi les lignées IRCS (-30% par rapport à B6), une fréquence relativement élevée de tératozoospermie (environ 20%) et un phénotype d'aspect atypique des vésicules séminales. Cette lignée ne porte qu'un seul fragment *spretus* détecté lors du génotypage sur le chromosome 11.

Je détaillerai dans le chapitre qui suit les résultats accumulés sur ces deux lignées. Ces résultats ne font pas encore l'objet de publication.

b) Etude de la lignée 44H, QTL de tératozoospermie

i Phénotype de tératozoospermie de la lignée 44H

1er Tératozoospermie dans la lignée 44H

Nous avons conduit des études physiologiques, afin de comprendre plus finement l'étiologie du phénotype et de faciliter l'identification d'un gène candidat. Le phénotype de tératozoospermie de la lignée 44H touche la majorité des spermatozoïdes produits (~50%). Ce chiffre ne considère que les anomalies importantes du noyau, alors que les spermatozoïdes de 44H montrent une gamme continue d'anomalies nucléaires (Figure 26) allant de la présence d'une légère protubérance sur la partie convexe du noyau proximale au flagelle (b), jusqu'à une forme complètement symétrisée de la tête qui passe alors d'une forme normale caractéristique en crochet (a) à une forme triangulaire (f).

Quand on cumule toutes les anomalies présentes, on atteint environ 80% de spermatozoïdes anormaux.

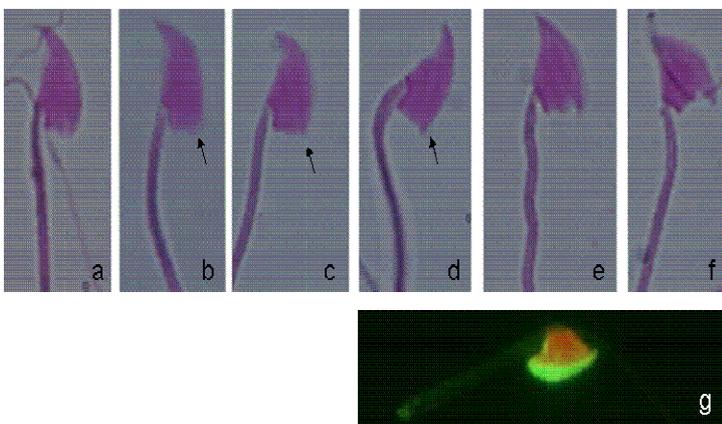


Figure 26 Spermatozoïdes épидидymaires de la lignée 44H (X100)

a) à f) : colorés à l'éosine

a) spermatozoïde normal

b) à d) apparition d'une protubérance nucléaire au pôle opposé au crochet (flèches)

e) et f) symétrisation de la tête

g) coloration PNA-FITC de l'acrosome d'un spermatozoïde anormal de 44H

Dans les lignées tératozoospermes (*azh*, par exemple), les anomalies nucléaires sont souvent associées à des anomalies de l'acrosome (absence ou mauvais positionnement), nous avons donc étudié la morphologie de l'acrosome des spermatozoïdes épидидymaires de 44H. L'observation des spermatozoïdes de 44H au microscope après coloration du noyau et de l'acrosome, montre un acrosome morphologiquement normal (figure 26 g). De plus, comme indiqué dans l'article 1, les spermatozoïdes de 44H présentent un taux de réaction acrosomique spontanée (sans induction) identique à ceux de B6, montrant que l'acrosome est normalement présent.

Afin de déterminer si l'anomalie morphologique des spermatozoïdes est acquise pendant la spermiogenèse ou provient d'une détérioration secondaire pendant la maturation épидидymaire, nous avons analysé des coupes histologiques du testicule de 44H. Nous avons pu observer un épithélium séminifère sans défaut apparent et un bon déroulement de la spermatogenèse. Cependant, en observant à fort grossissement les spermatides allongées (à partir du stade 10), nous avons pu noter qu'elles présentaient des anomalies de forme préfigurant l'anomalie des spermatozoïdes matures (figure 27). L'anomalie est donc issue d'un défaut affectant un processus de la spermiogenèse.

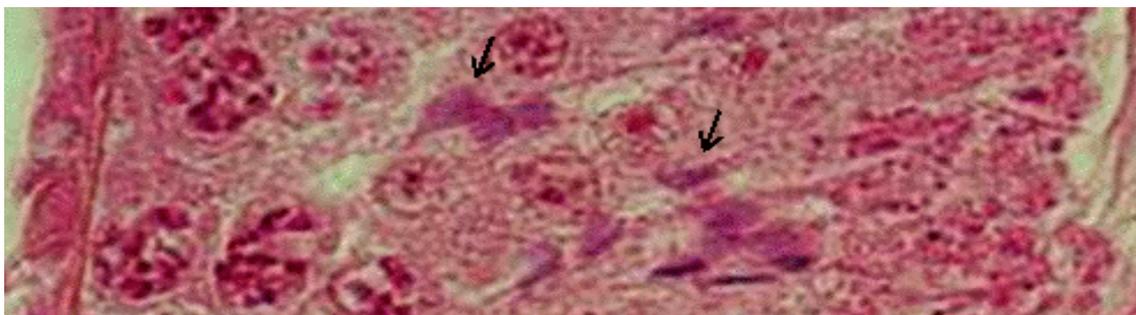


Figure 27 Histologie de l'épithélium séminifère d'un tube séminifère de 44H au stade XII, coloration HES (X100).

Les spermatides allongées d'étape 12 présentent une morphologie nucléaire similaire à celle des spermatozoïdes épидидymaires anormaux.

2e Impact de la tératozoospermie sur la fertilité de la lignée

Afin de juger des répercussions éventuelles de la forte tératozoospermie sur la fertilité des mâles de la lignée 44H, nous avons testé les spermatozoïdes de la lignée 44H en fécondation *in vitro* et *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons effectué des tests de fécondité en accouplant 5 mâles 44H de 8 semaines avec des femelles B6xCBA F1. Cinq mâles B6 du même âge ont été utilisés comme contrôles. Le nombre de petits par portée n'était pas significativement différent entre B6 et 44H (5.6 ± 1.8 vs 6.6 ± 0.8), de même que la durée moyenne entre la date d'accouplement et la parturition. Un suivi de la gestation après accouplement naturel par ultra-sonographie a confirmé que la tératozoospermie des mâles 44H n'a pas d'incidence sur la fécondation et la gestation.

Cependant, on ne peut exclure que la population des spermatozoïdes fécondants soit représentée uniquement par les 20% de spermatozoïdes apparemment normaux. Aussi, nous avons souhaité vérifier que les spermatozoïdes anormaux arrivaient effectivement en périphérie de l'ovocyte en accouplement naturel. Nous avons sacrifié deux femelles B6xCBA F1 le lendemain de l'accouplement avec des mâles 44H. Les cornes utérines ont été disséquées, les cumulus et les spermatozoïdes recueillis. Nous avons effectué l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes présents dans l'ampoule utérine et celle des spermatozoïdes épидидymaires des mâles utilisés pour le test. La population des spermatozoïdes péri-ovocytaires présentait le même pourcentage de gamètes anormaux que la population de spermatozoïdes épидидymaires, montrant qu'il n'y a pas de contre-sélection des gamètes anormaux lors de la remontée des voies femelles. L'observation microscopique des cumulus montrait la présence de spermatozoïdes anormaux en fixation à la zone pellucide.

Le fait que les spermatozoïdes anormaux soient aptes à remonter les voies femelles, et à rencontrer l'ovocyte, ainsi que la présence d'un acrosome normal et une bonne aptitude à

effectuer la réaction acrosomique (article 1) suggèrent que ces spermatozoïdes anormaux sont normalement féconds.

ii Fragments *spretus* et recherche de gènes candidats

La lignée 44H portent 8 fragments *spretus* détectés au génotypage, sur les chromosomes 3, 4, 12, 13 (2 fragments), 15, 16 et 19, le fragment *spretus* sur MMU16 étant encore en ségrégation dans la lignée, à l'état hétérozygote. Il s'agit de la lignée qui porte le plus de fragments introgressés, elle totalise environ 3.8% de génome *spretus*. Comme nous le verrons dans le chapitre II.B.1 iii, l'analyse du transcriptome testiculaire permet d'affiner le génotypage des IRCS, et de réduire le nombre de fragments effectivement présents dans le génome de la lignée 44H aux fragments sur les chromosomes 3, 4, 12, 13 (2 fragments), et 19, le fragment sur MMU16 n'a probablement pas été finalement fixé dans la lignée, et le fragment sur MMU15 était probablement un artefact de génotypage (il n'a été détecté que par un seul SNP).

Ces 6 fragments totalisent environ 901 gènes, dont 300 sont des séquences seulement annotées (LOC ou AK) et 124 sont des séquences exprimées (le cDNA en a été cloné) nommées génériquement RIKen DNA. Il n'est pas possible de proposer directement des gènes⁸ candidats pouvant conduire à une tératozoospermie parmi ces 901 entités. Trois démarches complémentaires d'analyse ont donc été entreprises : bioinformatique, cartographique et transcriptionnelle.

⁸ Le mot gène est à prendre dans une définition large, comprenant les séquences annotées, les gènes connus...

L'analyse bioinformatique a consisté à rechercher dans la liste des gènes des fragments *spretus* de 44H, les gènes d'expression testiculaire. La base de données GNF SymAtlas⁹ met à disposition les résultats de l'hybridation des ARNm de 61 tissus sur des puces d'expression contenant environ 40 000 transcrits. En croisant la liste des 901 gènes de la lignée 44H avec la matrice de données de SymAtlas, il est possible de trouver le profil d'expression tissulaire pour 739 gènes.

Si l'on choisit de ne conserver que les gènes dont le niveau d'expression dans le testicule est 2.5 fois supérieur à la médiane des niveaux d'expression dans les 61 tissus testés, on conserve une liste d'environ 80 gènes dont 6 séquences annotées et 24 Riken. En utilisant l'interface de MGI¹⁰, il est possible d'interroger les bases afin de connaître l'identité fonctionnelle des gènes (selon Gene Ontology¹¹), ainsi que leurs implications connues dans des phénotypes. Ces 80 gènes d'expression testiculaire appartiennent à des catégories fonctionnelles variées, et aucun d'entre eux n'a été impliqué dans un phénotype de tératozoospermie jusqu'à présent. Il est donc difficile par cette seule démarche de proposer un gène candidat parmi eux (si on admet la pertinence du filtre).

Nous avons conduit une analyse sur le transcriptome testiculaire de 44H, afin de déterminer des gènes candidats potentiels, que l'approche cartographique pourrait valider.

⁹ <http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>

¹⁰ <http://www.informatics.jax.org/>

¹¹ <http://www.geneontology.org/>

iii Analyse du transcriptome testiculaire de 44H

1er Comparaison du transcriptome testiculaire de 44H à celui de B6

Nous avons comparé les transcriptomes testiculaires des lignées 44H et B6, afin de trouver des gènes candidats pertinents pour expliquer les anomalies de morphologie du noyau des spermatozoïdes. L'obtention du transcriptome testiculaire de la lignée 44H et de la lignée B6 est décrite en matériel et méthode de l'article 2.

Tableau 3 Gènes d'expression testiculaire présents dans les fragments *spretus* de la lignée 44H et présentant une modification de leur niveau d'expression par rapport à B6 au seuil de X 2.

Symbole	Nom	ENTREZ ID	Rapport d'expression 44H/B6
3110070M22Rik	RIKEN cDNA 3110070M22 gene	67304	0,014
Trpm6	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6	225997	0,019
Espn	espn	56226	0,049
Tas1r1	taste receptor, type 1, member 1	110326	0,09
LOC434609			0,12
LOC633640			0,14
BC022687	cDNA sequence BC022687	217887	0,19
4930427A07Rik	RIKEN cDNA 4930427A07 gene	104732	0,29
Spata16	spermatogenesis associated 16	70862	0,29
1700028P14Rik	RIKEN cDNA 1700028P14 gene	67483	0,4
Chd5	chromodomain helicase DNA binding protein 5	269610	0,43
Fam108b	family with sequence similarity 108, member B	226016	0,44
Ndufaf2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 2	75597	0,44
BC046331	cDNA sequence BC046331	230967	0,48
Phf13	PHD finger protein 13	230936	0,49
Acot7	acyl-CoA thioesterase 7	70025	2,88

Si on considère comme transcriptionnellement modifiés les gènes dont le niveau d'expression dans le testicule de 44H est modifié de plus de 2 fois par rapport à B6 (en sur-expression ou en sous-expression), on trouve 746 gènes modifiés, dont 631 sont sous-exprimés (de X 2 à X 70) et 133 surexprimés (de X 2 à X 24). 173 de ces gènes sont dans les fragments *spretus* de la lignée 44H. En croisant cette liste avec la liste des gènes d'expression testiculaire dans les fragments, on peut isoler 16 gènes d'expression testiculaire forte, potentiellement en cause dans le phénotype (résumés dans le tableau 3 ci-dessus).

Aucunes données bioinformatiques ou bibliographiques ne sont disponibles concernant les gènes *LOC434609*, *LOC633640*, et *3110070M22Rik*.

Pour les gènes *BC022687*, *BC046331*, *4930427A07Rik* et *1700028P14Rik*, peu de données existe. En cherchant dans la base de données GermOnline¹², on peut trouver leurs profils d'expression dans les populations cellulaires du testicule. Par exemple, *4930427A07Rik* a une expression méiotique, et *1700028P14Rik* a une expression méiotique et fortement post-méiotique. Cependant, ces données ne permettent pas de faire émerger un gène candidat en particulier. En effet, même si l'on peut attendre qu'un gène post-méiotique ait plus de chance d'être impliqué dans la morphogenèse du noyau de la spermatide, un gène exprimé dans la spermatogonie ou dans la cellule de Sertoli peut être aussi impliqué.

Concernant les gènes dont la fonction est en partie connue :

-*Trmp6* est un canal à magnésium et calcium, qui a été impliqué dans des maladies d'hypomagnésie et d'hypocalcémie [186]. Ce canal est fortement exprimé dans les spermatides (d'après GermOnline). Le rôle de *Trmp6* **seul** dans la tératozoospermie de 44H est cependant improbable, car la lignée 137F qui présente un fragment *spretus* contenant ce gène, avec la même sous-expression de *Trmp6* dans le testicule, est beaucoup plus faiblement teratozoosperme (environ 20% d'anomalies comparé à plus de 50% pour 44H).

¹² <http://www.germonline.org/>

- *Tas1r1* est un récepteur gustatif, impliqué dans la perception du goût Umami [187]. Son expression est plus importante dans la population post-méiotique. Son rôle à ce niveau est inconnu.
- *Spata16* (spermatogenesis-specific gene 16) est un gène qui a été récemment associé à des globozoospermies (têtes rondes sans acrosome) chez l'homme [188]. Sa localisation dans l'acrosome a été démontrée chez la souris [189]. L'absence d'anomalies de l'acrosome des spermatozoïdes épидидymaires de 44H n'en fait pas un bon gène candidat pour le phénotype que nous observons.
- Aucune donnée bibliographique n'est en faveur de l'implication des gènes *Chd5*, *Ndufaf2*, *Phf13*, *Acot7* et *Fam108b*.
- Le gène de *l'Espin* est exprimé dans la cellule de Sertoli. La protéine Espin est impliquée dans la formation des faisceaux d'actine formant la spécialisation ectoplasmique (figure 12 pour rappel) [117, 190]. Il existe un mutant naturel de ce gène : le mutant Jerker ; celui-ci présente une surdité et des problèmes d'équilibre, car *l'Espin* est aussi exprimée dans l'oreille interne, au niveau des canaux semi-circulaires et de l'organe de Corti [191, 192]. Comme nous l'avons vu en introduction, l'inactivation d'un autre gène de la spécialisation ectoplasmique, la *Nectin2* induit une tératozoospermie [114] ; *l'Espin* nous a donc semblé être un candidat intéressant à étudier, avant même d'avoir la preuve cartographique de l'implication dans le phénotype du fragment sur MMU4 qui contient ce gène.

2e L'Espin, gène candidat malheureux

- Analyse expressionnelle

Le gène de l'*Espin* existe sous 4 isoformes ayant chacune un promoteur (Figure 28). Certaines de ses isoformes présentent, en plus, des épissages alternatifs (la base de données Ensembl¹³ répertorie 13 transcrits différents).

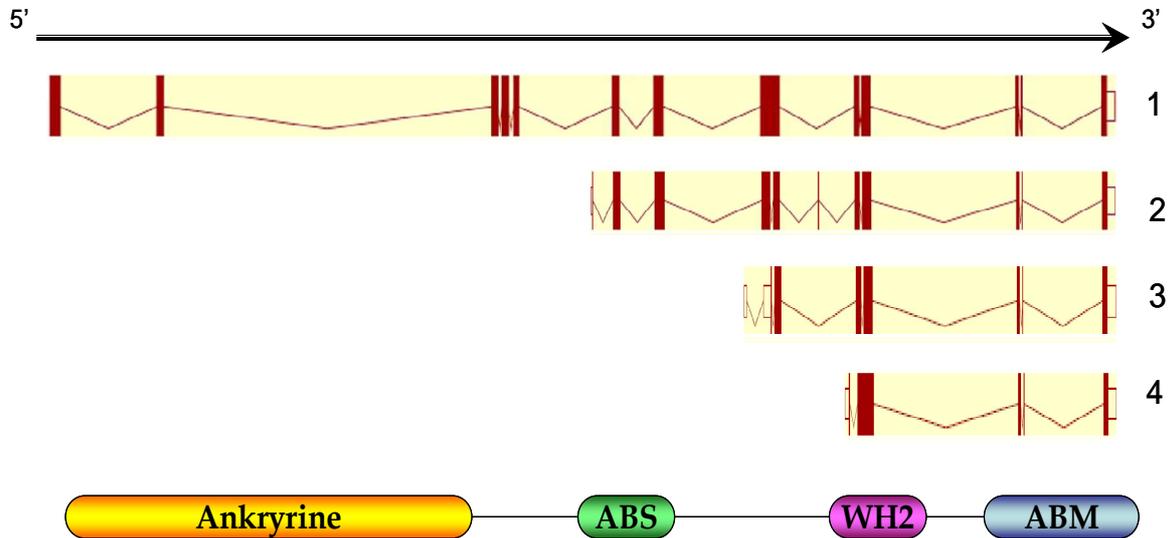


Figure 28 Modèle simplifié du gène de l'*Espin* de souris d'après la base de données Ensembl et domaines protéiques :

Ankyrine,

ABS : *Actin binding sequence*,

WH2 : *Wiskott-Aldrich homology 2*,

ABM : *Actin-bundling module*.

L'ensemble des isoformes de l'*Espin* se termine par les mêmes exons C-terminaux, codant le domaine ABM (*actin-bundling module*). Ce domaine interagit avec l'actine, il est nécessaire et suffisant pour induire la formation de faisceaux d'actine. D'autres domaines d'interaction avec l'actine sont décrits : WH2 (*Wiskott-Aldrich homology 2*), possédé par toutes les isoformes et ABS (*actin binding sequence*), domaine porté par les isoformes 1 et 2 [193]. L'isoforme 1 possède en plus un domaine Ankyrine de 8 répétitions, il s'agit d'un domaine d'interaction protéine-protéine dont le rôle exact est inconnu. La cellule de Sertoli n'exprimerait que le variant 1 [117], alors que l'oreille interne par exemple, exprimerait les variants 1 à 4 et la rétine, les variants 1, 3 et 4 [194].

¹³ <http://www.ensembl.org/>

Les puces d'expression Nimblegen interrogent 9 sondes par transcrite, pour l'*Espin*, les transcrits 1, 2 et 4 sont interrogés spécifiquement. Les sondes sont placées soit dans les exons communs du gène soit dans les régions 5' UTR spécifiques des différents transcrits. En observant les résultats d'hybridation des ARN testiculaires de B6, on peut conclure que le testicule de B6 exprime la totalité des transcrits testés, puisque la fluorescence des sondes correspondantes est supérieure à 500 (les sondes qui correspondent au variant 1 ont une fluorescence moyenne de 2000, le bruit de fond est d'environ 100). Si on compare l'expression de l'*Espin* sonde par sonde entre B6 et 44H, on observe que seules les sondes correspondant au variant 1 sont éteintes. 44H n'exprime donc pas le variant 1 de façon spécifique (Figure 29).

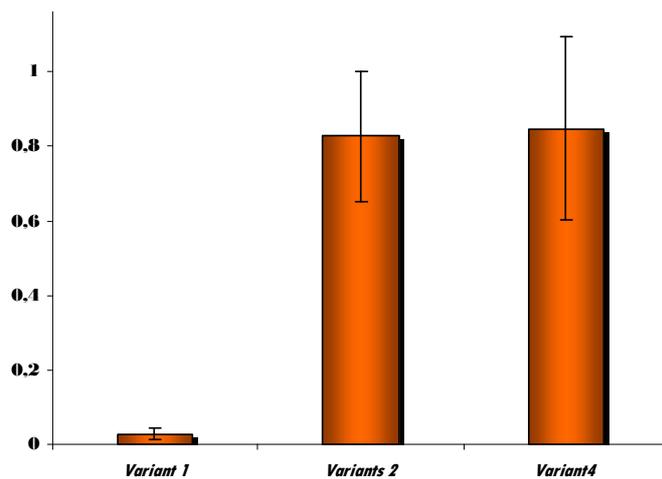


Figure 29 Histogramme des rapports de niveau d'expression des variants testiculaires de l'*Espin* interrogés par la puce d'expression entre 44H et B6

La valeur donnée en ordonnée est la moyenne des rapports (44H/B6) des fluorescences des 9 sondes interrogées. Les barres d'erreur représentent l'écart type de cette moyenne.

Seul le variant 1 est significativement sous-exprimé (40 fois). La fluorescence pour les sondes correspondantes est au niveau du bruit de fond.

- Recherche de la protéine dans des extraits testiculaires

Afin de vérifier l'absence de la protéine correspondant au variant 1 dans le protéome de 44H, nous avons réalisé un western blot en utilisant deux anticorps : le premier est un anticorps commercial spécifique du variant 1 (Mouse Anti-Espin Monoclonal Antibody, Clone 31, BD Biosciences) dirigé contre un peptide de l'exon 8, le second anticorps est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la totalité de la protéine (anti pan-espin), qui nous a été généreusement donné par J.R. Bartles.

Le western blot a confirmé l'absence de variant 1 dans le testicule de 44H en utilisant les deux anticorps. La révélation avec l'anticorps polyclonal anti pan-Espin fait apparaître une bande faible à 110 KDa pour 44H, qui représente en intensité moins de 1% de la bande obtenue avec l'extrait protéique de B6 (Figure 30).

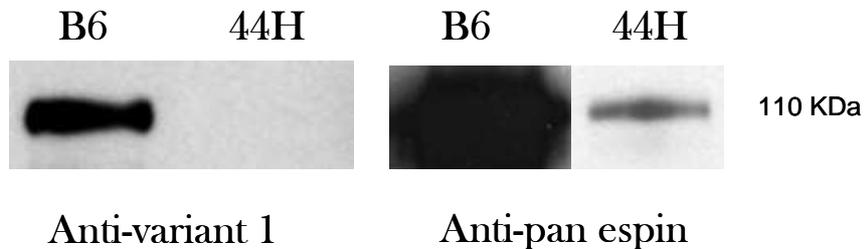


Figure 30 Western blot d'extrait testiculaire de souris B6 et 44H, révélé avec soit l'anticorps anti variant 1, monoclonal, soit l'anti pan-Espin polyclonal
Le variant 1 de l'Espin a un poids moléculaire attendu à 110 Kda.
Les deux westerns blots démontrent la forte sous expression du variant 1 chez 44H.

- Recherche d'anomalies de la spécialisation ectoplasmique chez 44H

Afin de juger des répercussions éventuelles sur la spécialisation ectoplasmique (SE) de l'absence du variant 1 de l'Espin, nous avons analysé la SE en microscopie optique et électronique. Dans un premier temps, nous avons effectué un marquage de la SE en utilisant l'anticorps anti pan-Espin sur coupe paraffinée de testicule (Figure 31).

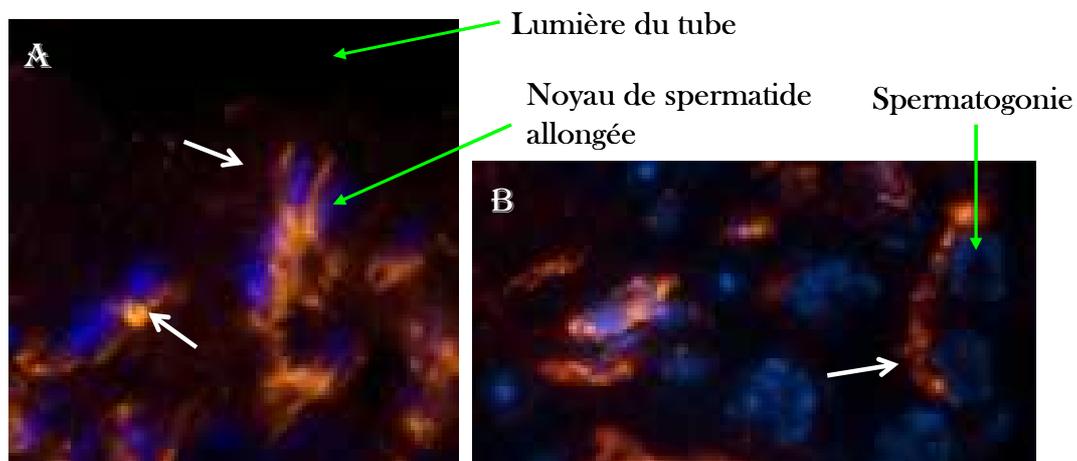


Figure 31 Immunomarquage de l'Espin par l'anticorps anti pan-Espin sur coupe testiculaire de 44H (contre-coloration des noyaux au dapi) (X100).

A) Espin de la spécialisation ectoplasmique apicale (flèches blanches) associée à des spermatides allongées.

B) Espin de la spécialisation ectoplasmique basale, au niveau de la barrière hémato-testiculaire

Nous avons pu montrer que le testicule de 44H présentait un marquage normal des spécialisations basales et apicales. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse de l'expression de plusieurs isoformes de l'*Espin* dans le testicule (nous avons effectué des westerns blots bidimensionnels d'extraits testiculaires de B6 et 44H, révélés par l'anti pan-Espin, qui montrent la présence de spots aux tailles attendues pour les variants 2, 3 et 4). Les spécialisations ectoplasmiques semblent être correctement mises en place chez 44H.

Afin de voir si les têtes les plus anormales sont associées à des anomalies particulières de la spécialisation ectoplasmique, nous avons effectué un marquage de l'actine des spécialisations ectoplasmiques par la phalloïdine-FITC sur des dilaceras testiculaires (Figure 32). Les spécialisations ectoplasmiques associées aux têtes des spermatides de forme anormale possèdent un réseau d'actine apparemment correctement formé et bien positionné.

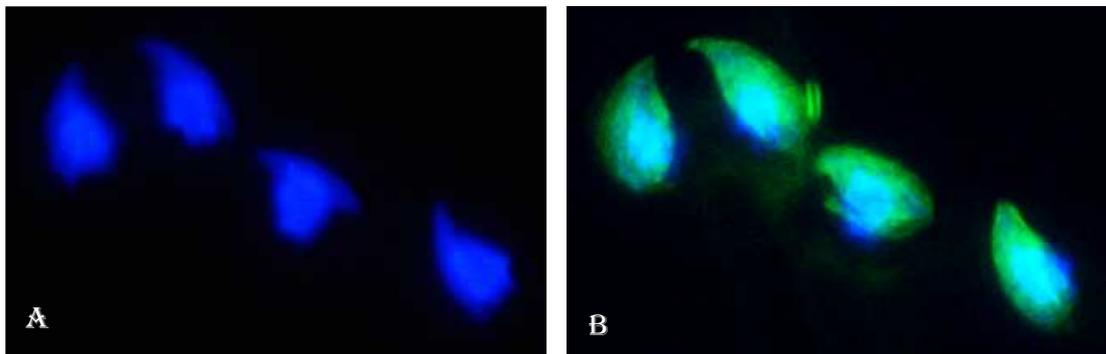


Figure 32 Marquage de l'actine des spécialisations ectoplasmiques apicales entourant les têtes des spermatides anormales de 44H

A) Noyau des spermatides marquées au Dapi

B) Actine marquée à la phalloïdine-FITC de la SE apicale. Les faisceaux d'actine entourent correctement la tête des spermatides anormales.

N'ayant pas trouvé d'anomalies grossières de la SE apicale, nous avons conduit une analyse du tissu testiculaire sur deux mâles 44H en microscopie électronique à transmission. Nous avons étudié la structure de la SE apicale et de ces trois compartiments (membranes, faisceau d'actine et réticulum endoplasmique) aux différents stades de la spermiogenèse.

Nous avons pu observer que la SE apicale de 44H ne présentait pas de différence comparée à la SE apical du témoin B6. Comme on peut le voir sur la figure 33, les différents compartiments de la SE sont normalement présents, et adéquatement placés, les faisceaux d'actine sont de forme et d'espacement normal. Ce cas est représentatif des nombreuses spermatides que nous avons analysées. Nous n'avons pas observé de défauts spatio-temporels de la mise en place de spécialisation ectoplasmique (apparition normale au stade 8, et pas de désengagement précoce de la SE).

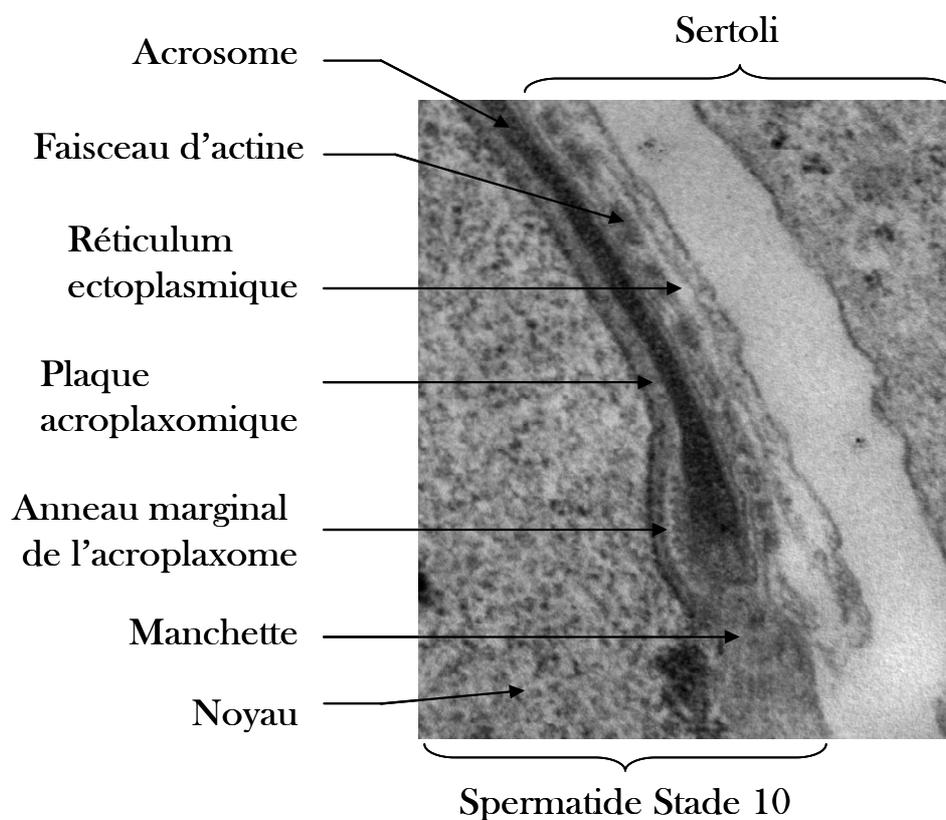


Figure 33 Photographie en microscopie électronique de la spécialisation ectoplasmique apicale d'une spermatide allongée de 44H (X 40 000)

On note la présence des trois compartiments de la spécialisation ectoplasmique, normalement disposés.

La chromatine est en début de condensation.

L'anneau marginal de l'acroplaxome ainsi que l'anneau périnucléaire de la manchette sont visibles.

L'absence d'anomalies structurales de la SE, mais si elle ne préjuge pas du bon fonctionnement de la SE, tend à remettre en cause l'implication de l'*Espin* dans la pathogénèse de la tératozoospermie de la lignée 44H.

iv Vers la cartographie fine du QTL de tératozoospermie

Parallèlement à ce travail sur *l'Espin* et la SE, une analyse cartographique classique a été menée. Elle a consisté en la dissection des bases moléculaires de la tératozoospermie de 44H en créant les lignées congéniques portant chacune, à l'état homozygote, un seul des fragments *spretus* de la lignée 44H. Cette analyse, que nous avons entreprise depuis deux ans, n'a pas encore complètement abouti, certains fragments étant encore en cours de séparation. Toutefois, nous avons pu obtenir les lignées portant les fragments *spretus* sur MMU3 (44Hrc3), MMU4 (44Hrc4) et MMU19 (44Hrc19).

- Etude de la lignée recombinante 44Hrc4 et du mutant Jerker

En parallèle de ces études physiologiques de 44H, nous avons établi une lignée sous-congénique ne portant que le fragment *spretus* du chromosome 4, comprenant *l'Espin*. Pour ce faire, nous avons rétro-croisé sur deux générations des individus 44H avec des individus B6 afin d'obtenir des individus hétérozygotes pour le fragment *spretus* porté sur MMU4. Nous avons sélectionné ces individus en génotypant des marqueurs microsatellites aux extrémités du fragment. Du fait de la faible fréquence des individus ne portant que le fragment sur MMU4 dans la population en ségrégation (1/64), nous avons croisé le premier individu *ad hoc* avec un individu B6, afin d'obtenir des couples d'hétérozygotes en F1. Ces couples nous ont permis d'obtenir le fragment isolé dans un fond B6 à l'état homozygote (soit 4 générations, avec un délai de 3 mois par génération).

L'analyse morphologique des spermatozoïdes des mâles de la lignée 44Hrc4 a révélé qu'ils ne présentaient pas le phénotype extrême de la lignée 44H : leur taux moyen de spermatozoïdes anormaux est de 10% environ. Cette observation n'est pas en faveur d'une implication de *l'Espin* seule dans la tératozoospermie de la lignée 44H.

Nous avons par ailleurs obtenu des épидидymes des souris mutants Jerker et de souris sauvages du même fond génétique (dons généreux du Professeur Karen Steel et d'Agnieszka Rzadzinska, Sanger Institute). Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre le taux de tératozoospermie des mâles Jerker et celui des mâles sauvages. Comme le mutant Jerker n'exprime aucune des isoformes de l'*Espin*, cette observation exclut définitivement l'implication de l'*Espin* dans la morphogenèse de la tête de spermatozoïdes chez la souris.

On peut voir dans cet exemple une limite de l'approche gène candidat : le gène de l'*Espin* était un candidat théoriquement bon, un faisceau d'arguments bibliographiques et expressionnels semblait indiquer que ce gène était le gène responsable de la tératozoospermie des mâles 44H. L'approche cartographique, seule approche non ambiguë, a montré que l'*Espin* ne pouvait pas être impliquée de façon majeure dans la tératozoospermie de 44H.

- Etude des lignées recombinantes pour les autres fragments *spretus* de 44H

Les lignées 44Hrc3 et 44Hrc19 ont pu être obtenues de la même façon que la lignée rc4 (en 4 générations). Les spermatozoïdes de ces lignées ne présentent pas le phénotype de tératozoospermie, excluant l'implication des fragments 3 et 19 seuls dans le phénotype (et donc probablement l'implication des gènes qu'ils contiennent, comme *Trmp6* ou *Spata16*).

L'établissement des lignées 44Hrc12, 44H rc13a et 44Hrc13b a posé plus de problèmes, du fait d'une mortalité importante, et de comportements de cannibalisme des premiers individus hétérozygotes. Des résultats préliminaires du phénotypage de deux mâles, issus de la même portée, homozygotes pour les deux fragments sur MMU13, montrent une tératozoospermie à hauteur de 60% environ. D'autres individus doivent être phénotypés avant de pouvoir conclure sur l'implication des fragments sur MMU13.

Afin de comprendre la mise en place de l'anomalie morphologique des spermatozoïdes de 44H, nous avons analysé les différentes structures impliquées dans la morphogenèse de la tête des spermatozoïdes (la manchette, la condensation nucléaire et l'acroplaxome) en microscopie électronique. Comme on peut le voir sur la figure 33, l'anneau marginal de l'acroplaxome est normalement présent. Nous avons recherché des anomalies de positionnement de la manchette, comme pour le mutant *azh*, mais aucun défaut n'a pu être observé. Le processus de condensation de la chromatine ne semble pas être défectueux, ce qui est cohérent avec la fécondité normale des mâles de la lignée 44H.

L'unique anomalie que nous avons pu détecter dans le testicule de 44H est une irrégularité de la forme des noyaux des spermatides à partir du stade 8, au niveau du pôle acrosomique, associée à une épaisseur et une granulosité anormale de l'acrosome (figure 34). Nous avons pu observer la persistance du granule acrosomique dans les spermatides de stade 10, alors que cette structure est normalement visible dans les spermatides de stade 5, mais complètement étalée au stade 8. Ce phénotype, qui a été noté sur un grand nombre de spermatides chez 44H, n'a pas été observé chez le témoin B6. Lors des stades ultérieurs, alors que la chromatine de la spermatide se condense, l'acrosome a un aspect normal identique au témoin, expliquant pourquoi aucune anomalie de l'acrosome n'est notable pour les spermatozoïdes épидидymaires. Ainsi, le défaut au niveau acrosomique semble être transitoire, seul persiste l'anomalie de morphologie du noyau.

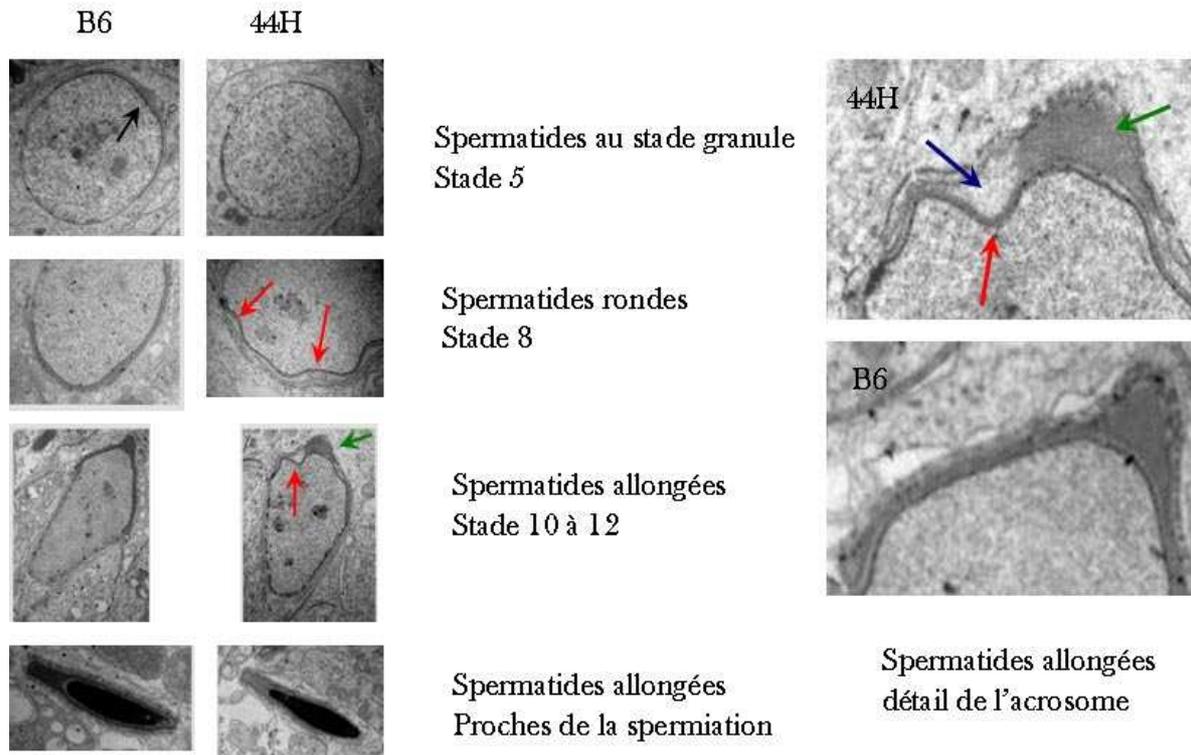


Figure 34 Photographies en microscopie électronique de spermatides de testicules de B6 et de 44H (x10 000)

Au niveau des spermatides rondes précoces (stade granule, flèche noire), aucune différence n'apparaît entre B6 et 44H.

A partir du stade 8, certaines spermatides de 44H présentent des encoches dans le noyau que l'on retrouve dans les stades suivants (flèche rouge). Ces encoches sont associées à des anomalies de l'acrosome : comme on peut le voir sur le détail de la spermatide allongée, la matrice acrosomiale au niveau de l'encoche présente un aspect anormalement clair (flèche bleue), et le granule est anormalement présent (flèche verte).

Lorsque la chromatine se condense, l'aspect de l'acrosome de 44H devient comparable à B6.

Ce phénotype, associant un défaut d'étalement du granule acrosomique à une malformation apicale du noyau des spermatides, pourrait impliquer :

- un défaut au niveau de la plaque acroplaxomique, puisque celle-ci intervient dans les processus d'étalement de l'acrosome [79].
- un défaut de biogénèse de l'acrosome. En effet, l'invalidation du gène *Zbp1* chez la souris, codant une protéine localisée dans l'acrosome, provoque un phénotype qui présente certaines similarités avec le phénotype que nous avons observé, c'est à dire : la persistance du granule acrosomique et des malformations apicales du noyau des spermatides entre autres [195].

A ce stade de l'étude, il n'est pas possible de proposer un gène candidat parmi les 449 gènes des fragments présents sur les chromosomes 12 et 13, aucun d'entre eux n'ayant été impliqué dans la biogénèse de l'acrosome ou de l'acroplaxome. Cependant ces fragments contiennent de nombreux gènes non caractérisés, exprimés spécifiquement dans le testicule, et présentant pour certains des profils d'expression post-méiotique spécifique. Seule l'analyse en cartographie fine permettra de conclure sans ambiguïté.

c) Etude de la lignée 97C, QTL de faible poids testiculaire et de tératozoospermie

i Analyses phénotypiques de la lignée 97C

1er Phénotype testiculaire

Suite à la primo-localisation de QTL de fertilité mâle dans le modèle IRCS, nous avons choisi d'étudier la lignée 97C. Lors du génotypage, cette lignée ne portait qu'un seul fragment *spretus* sur le chromosome 11, ce qui représente un cas idéal pour la cartographie fine de QTL. Cette lignée présente la plus forte réduction du poids testiculaire observée dans les IRCS (-30% par rapport à B6) associée à une tératozoospermie modérée, touchant environ 20 % des gamètes épидидymaires (l'anomalie morphologique est semblable à celle observée dans 44H). Cette lignée présente en outre un phénotype au niveau des vésicules séminales (voir chapitre ci-dessous). La réserve spermatique épидидymaire totale à 8 semaines *post-partum* ne semble pas être altérée, malgré la réduction de poids testiculaire. Cependant, la réserve épидидymaire étant une mesure peu sensible de la production de spermatozoïdes, une diminution modérée peut passer inaperçue.

L'histologie testiculaire ne fait pas apparaître de défaut majeur : l'épithélium séminifère est normalement structuré, et les populations de cellules somatiques et germinales normalement présentes. Le diamètre des tubes séminifères apparaît toutefois plus petit en moyenne, puisqu'une diminution d'environ 25 % ($p = 5 \cdot 10^{-12}$) par rapport à B6 est observable. Afin de mieux caractériser ce phénotype dans la lignée 97C, nous avons suivi l'évolution du poids testiculaire et de son histologie en fonction de l'âge (figure 35 A).

La différence de poids testiculaire entre 97C et B6 devient significative à partir de 28 JPP. Cependant, dès 21 JPP, les tubes séminifères de 97C présentent une réduction significative de leur diamètre par rapport au témoin (-7%, $p = 0.009$) (Figure 35 B).

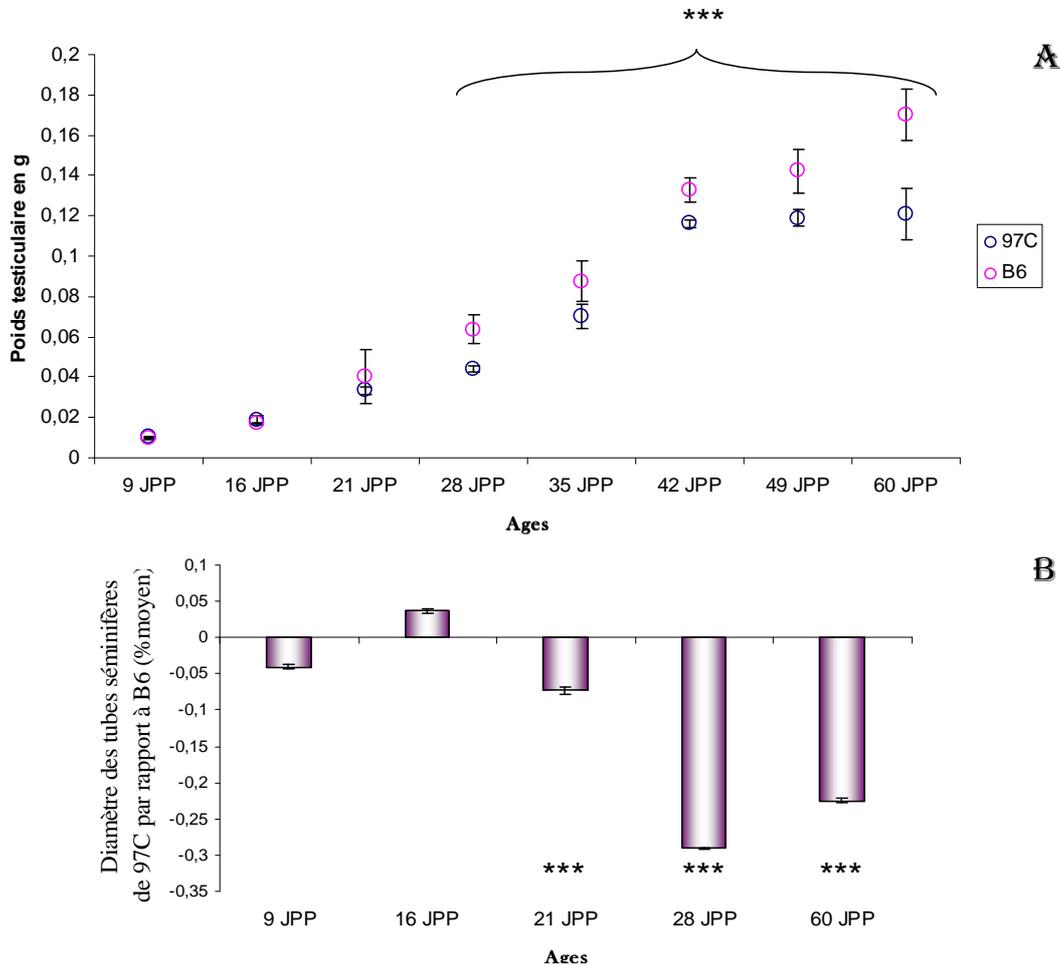


Figure 35 Analyse du développement testiculaire dans la lignée 97C

A) Courbes du poids testiculaire en fonction de l'âge (en JPP) de la lignée B6 et de la lignée 97C (poids moyen en g sur 4 individus \pm SEM).

B) Diamètre moyen des tubes séminifères de la lignée 97C exprimés en % par rapport à B6, en fonction de l'âge.

La différence de taille des tubes séminifères entre B6 et 97C apparaît donc pendant la mise en place de la spermiogenèse, lors de l'apparition des premières spermatides rondes (Figure 7). Comme le poids testiculaire augmente fortement pendant la première vague de spermiogenèse, il est néanmoins possible que dans le testicule de 97C cette étape se déroule normalement, mais qu'elle fasse apparaître des différences entre B6 et 97C, dont l'origine moléculaire ou cellulaire est plus précoce.

2e Phénotype des vésicules séminales

Les vésicules séminales de 97C présentent un phénotype caractérisé par une couleur anormale des sécrétions séminales : alors que les vésicules séminales des souris sont normalement laiteuses, elles sont translucides chez 97C. Les vésicules séminales de 97C apparaissent toutefois correctement formées : leur poids n'est pas significativement différent du témoin, et leur histologie montre un épithélium sécrétoire sans défaut apparent.

Nous avons étudié le profil global de migration des protéines des sécrétions séminales (selon le protocole de Lundwall [37]) de 97C comparé à celui de B6 et de SEG (figure 36). Il ne semble pas qu'une protéine majeure des sécrétions séminale manque chez 97C, les profils protéiques de B6 et de 97C étant comparables.

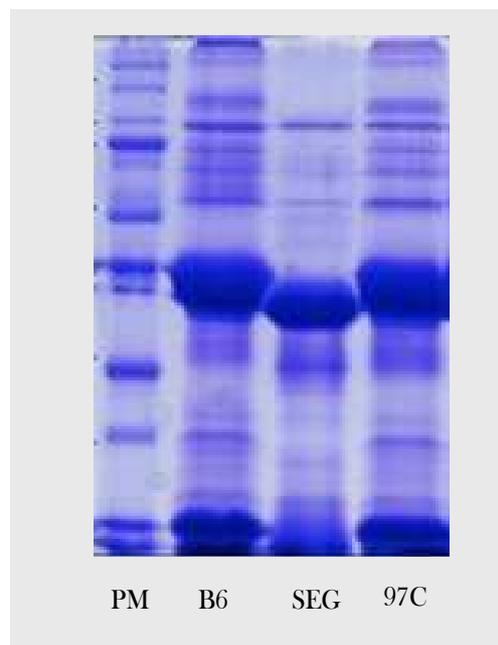


Figure 36 Profils de migration électrophorétique des protéines des sécrétions séminales de mâles des lignées B6, SEG, et 97C
Aucune différence majeure n'est visible entre les profils de B6 et de 97C.
Révélation au bleu de Coomassie (PM : poids moléculaires)

Afin de juger de la répercussion de ce phénotype original sur la fertilité mâle, nous avons testé en accouplement des mâles 97C avec des femelles B6*CBA F1. Nous avons observé une formation normale du bouchon vaginal le lendemain de l'accouplement, et les femelles ont donné naissance, après gestation, à des portées de tailles comparables à celles obtenues avec des mâles témoins. Le phénotype touchant les vésicules séminales nous a donc semblé peu prometteur dans notre recherche de gènes d'infertilité transposables à l'homme ou aux animaux d'élevage.

ii Génotype de 97C et recherche de gènes candidats

1er Approche bioinformatique

La carte génétique de la lignée 97C établie lors du génotypage montre la présence d'un seul fragment *spretus* sur MMU11, cependant l'analyse du transcriptome testiculaire de la lignée 97C nous a permis de trouver un fragment *spretus* supplémentaire sur le chromosome 6, positionné entre deux marqueurs (voir chapitre II.B.1 iii). Les deux fragments contiennent 222 gènes, dont 40 sont des séquences annotées et 37 des séquences exprimées (de type Riken). Parmi ces 222 gènes, 18 gènes sont d'expression testiculaire (tableau 4 ci-dessous).

Un gène en particulier est connu pour influencer la forme du noyau des spermatozoïdes : *Zbp1*. *Zbp1* est une protéine intervenant dans la liaison à la zone pellucide, dont l'inactivation conduit à une tératozoospermie associée à des anomalies de l'acrosome et du flagelle conduisant à une stérilité mâle [195]. Il existe des différences importantes entre le phénotype de 97C et celui du KO de *Zbp1* : les spermatozoïdes de 97C ne présentent pas d'anomalies flagellaires ou acrosomiques, et la morphologie de leur tête est différente de celle observée dans le KO de *Zbp1*.

Il semble peu probable que *Zpbp1* joue un rôle dans la tératozoospermie modérée de 97C, même si le KO peut avoir des effets plus drastique qu'une variation de séquence entre *musculus-spretus*.

Tableau 4 Liste des gènes d'expression testiculaire présents dans les fragments de 97C sur les chromosomes 6 et 11

Symbole	Nom	ID ENTREZ
4921507P07Rik	RIKEN cDNA 4921507P07 gene	70821
4930415F15Rik	RIKEN cDNA 4930415F15 gene	73862
4930562D19Rik	RIKEN cDNA 4930562D19 gene	216516
AI894139	expressed sequence AI894139	101197
Ankrd36	ankyrin repeat domain 36	76389
Ccdc117	coiled-coil domain containing 117	104479
Cntnap2	contactin associated protein-like 2	66797
D330028D13Rik	RIKEN cDNA D330028D13 gene	231946
Ezh2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	14056
Figl1	fidgetin-like 1	60530
Gas2l1	growth arrest-specific 2 like 1	78926
Osbp2	oxysterol binding protein 2	74309
Pgam2	phosphoglycerate mutase 2	56012
Stk31	serine threonine kinase 31	77485
Sunc1	Sad1 and UNC84 domain containing 1	194974
Tra2a	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)	101214
Zpbp	zona pellucida binding protein	53604

Aucun autre des gènes de ces deux régions n'a été impliqué jusqu'à présent dans un phénotype de développement ou de fonctionnement testiculaire. Afin d'identifier des gènes candidats, nous avons effectué une analyse comparée du transcriptome testiculaire de 97C, à celui de B6.

2e Approche transcriptomique

Nous avons recherché les gènes dont l'expression est modifiée plus de deux fois dans le testicule de 97C par rapport à B6. Nous avons trouvé 155 gènes modifiés, répartis dans les fragments (44 gènes), et dans le fond génétique (111 gènes). Parmi ceux-ci, 7 gènes ont une expression testiculaire significative (tableau 5).

Tableau 5 Liste des gènes dont l'expression est modifiée dans le testicule de 97C comparé à B6

En grisé, les gènes dans les fragments *spretus*

Symbole	Nom	Chromosome	ID ENTREZ	Rapport d'expression 97C/B6
Ccdc60	coiled-coil domain containing 60	5	269693	2,4
Hoxa4	homeo box A4	6	15401	0,4
Cntnap2	contactin associated protein-like 2	6	66797	0,19
D330028D13Rik	RIKEN cDNA D330028D13 gene	6	231946	0,17
Rnf121	ring finger protein 121	7	75212	2,31
Ankrd36	ankyrin repeat domain 36	11	76389	0,28
Chmp6	chromatin modifying protein 6	11	208092	0,45

Aucun de ces 7 gènes n'a été directement impliqué dans un phénotype testiculaire jusqu'à présent

Par ailleurs, les données du transcriptome testiculaire peuvent être étudiées pour mieux caractériser le phénotype de réduction du poids testiculaire de 97C. En effet, le niveau d'expression de gènes marqueurs particuliers peut être pris comme un indicateur du bon déroulement des différents processus testiculaires. Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les gènes dérégulés dans le transcriptome testiculaire de 97C appartenaient à des familles fonctionnelles de gènes. Pour cela, nous avons utilisé l'outil de clustering fonctionnel de la base de données DAVID. Les gènes dont l'expression est modifiée dans le testicule de 97C n'appartiennent pas à des familles fonctionnelles particulières, il ne semble donc pas qu'il y ait de perturbations des grandes voies métaboliques ou régulatrices dans le testicule de 97C.

Nous avons aussi cherché à savoir si les gènes dérégulés étaient exprimés dans des types cellulaires particuliers. Pour cela, nous avons étudié le niveau d'expression d'un ensemble de gènes connus pour être impliqués dans la fonction testiculaire : 15 gènes impliqués dans les fonctions des cellules somatiques du testicule, 14 dans la régulation des spermatogonies, 59 dans les processus méiotiques, 25 dans la différenciation des spermatides et 125 dans les fonctions des spermatozoïdes (Liste extraite de la revue par M. Matzuk, 2008 [21]). Nous n'avons pas observé de perturbation de l'expression de ces gènes dans le testicule de 97C, qui permettrait de faire l'hypothèse d'un déséquilibre dans la représentation des populations de l'épithélium séminifère adulte, d'un déficit d'imprégnation hormonale ou de perturbations majeures dans la régulation de la spermiogenèse.

Afin de positionner les QTL impliqués dans les phénotypes testiculaires et des vésicules séminales portés par 97C, nous avons créé des lignées congéniques portant séparément les fragments *spretus* sur le chromosome 6 (97Crc6) et sur le chromosome 11 (97Crc11).

iii Approche cartographique

1er Création et analyse des lignées congéniques

Nous avons créé et phénotypé les lignées congéniques pour les fragments du chromosome 6 et du chromosome 11, respectivement 97Crc6 et 97Crc11. Le phénotype des vésicules séminales ségrége avec le fragment du chromosome 6, alors que le faible poids testiculaire et la tératozoospermie ségrégent avec le fragment sur le chromosome 11 (Figure 37).

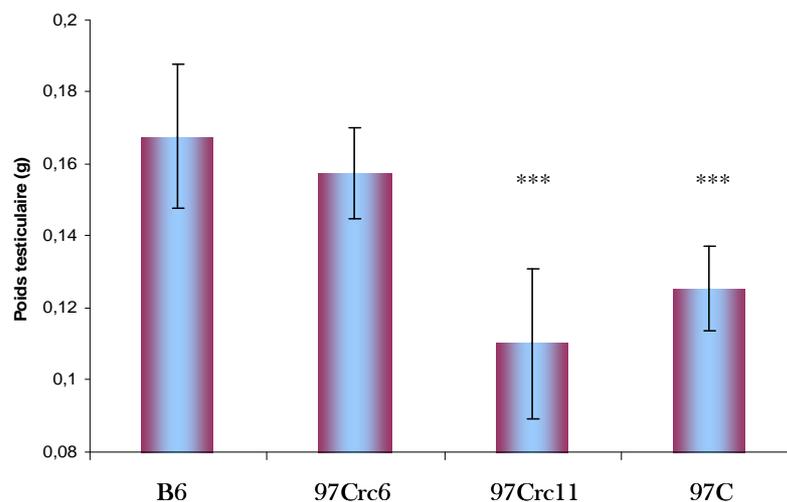


Figure 37 Histogramme des poids testiculaires des lignées B6, 97Crc6, 97Crc11 et 97C (moyenne ± σ)

Le poids testiculaire de la lignée 97Crc6 (n=10 individus) ne présente pas de différence significative comparé à B6 (p=0.20). La lignée 97Crc11 (n=8) présente un phénotype de réduction du poids testiculaire identique à celui de la lignée 97C (différence avec B6 : $p < 5 * 10^{-7}$).

Pour la suite de l'étude, nous nous sommes concentrés sur les phénotypes testiculaires de la lignée 97Crc11. Nous avons créé des lignées portant des sous-parties du fragment *spretus* afin de disséquer les QTL (lignées sous-congéniques).

2e Etude en lignées sous-congéniques de 97Crc11

Afin de créer des lignées ne portant que des parties du fragment *spretus* de 97Crc11, nous avons établi une population F2 à partir de 97Crc11. Nous avons génotypé environ 150 individus F2 sur un ensemble de 12 microsatellites répartis le long du fragment *spretus* à la recherche de recombinants. Le croisement en retour sur B6 des individus recombinants a permis d'obtenir les parties du fragment à l'état hétérozygote. Les individus F1 (hétérozygotes) servent à établir une population F2 qui est génotypée à la recherche d'homozygotes fondateurs de la lignée sous-congénique. De cette façon, nous avons établi 6 lignées (figure 38), dont 3 sont à l'état homozygote, et phénotypées sur le poids testiculaire et les anomalies spermatiques (lignées 97Crc11a, b et c).

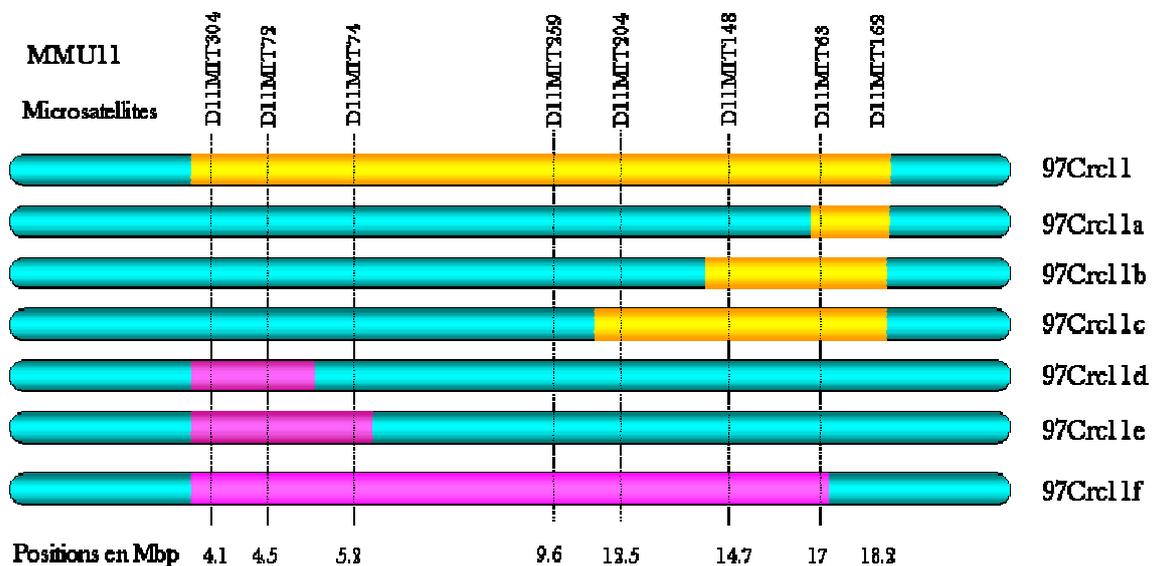


Figure 38 Représentation des génotypes des lignées sous-congéniques de 97Crc11

En bleu, sont représentées les parties B6 du chromosome 11. L'homozygotie *spretus* est représentée en jaune, l'hétérozygotie en rose.

La lignée 97Crc11c présente une réduction du poids testiculaire significative de 25% ($n=6$; $p=9*10^{-4}$) associée à une tératozoospermie de 35% en moyenne. Les lignées (a) et (b), ainsi que les individus hétérozygotes des lignées (d) et (e), ne présentent pas de déviation significative par rapport à B6 pour les deux phénotypes. Ces premiers résultats demandent à être confirmés sur un nombre plus important d'individus, et la dissection de la région ne sera complète qu'une fois les lignées (d), (e) et (f) phénotypées à l'état homozygote.

Cependant, ces résultats permettent de proposer une région QTL candidate contrôlant le poids testiculaire et la morphogénèse de la tête des spermatozoïdes, comprise entre les microsatellites D11MIT259 (9.6 Mbp) et D11MIT148 (14.7 Mbp). Des croisements visant à créer une lignée congénique pour cette partie de fragment isolée sont en cours de réalisation. Cette région contrôle les deux phénotypes testiculaires de tératozoospermie et de réduction du poids de la gonade mâle. Il est donc possible que ces deux phénotypes soient liés.

La région candidate contient 10 gènes (tableau 6).

Tableau 6 Gènes de la région QTL candidate impliquée dans les phénotypes de faible poids testiculaire et de tératozoospermie sur le chromosome 11

Symbole	Rapport d'expression 97C/B6	Niveau d'expression dans B6
LOC482534	0,49	60
Ddc	0,83	75
4930512M02Rik	0,36	94
A930041G11Rik	1,75	129
LOC634436	0,57	134
Zfpn1a1	0,83	137
Cobl	1,61	192
Grb10	0,79	1407
Zpbp	0,77	7259
4930415F15Rik	0,87	10969
Fig1l	0,99	16618

Parmi ces 10 gènes, 4 présentent une expression testiculaire significative : *Grb10*, *Zpbp*, *4930415F15Rik* et *Figln1*, les autres gènes ont des niveaux d'expression sur la puce d'expression testiculaire de B6 proche du seuil de détection (environ 100 de niveau de fluorescence). Les données de la base SymAtlas confirment leur très faible niveau d'expression dans le testicule adulte.

-*Grb10* (*growth factor receptor-bound protein*) est un gène impliqué dans la régulation de la signalisation de l'insuline, en se liant notamment au récepteur à l'insuline et à *Igf1r* ([196]). L'inactivation de ce gène chez la souris provoque la croissance exagérée de certains organes (muscle, pancréas, poumon et placenta), ce qui permet d'imputer à *Grb10* une fonction d'inhibiteur de croissance [197, 198]. Le testicule n'a pas été étudié dans les deux modèles d'inactivation de *Grb10*, alors que ce gène est exprimé dans les cellules de Sertoli et les spermatogonies. Ce gène pourrait intervenir dans le développement testiculaire, via son implication dans la voie de l'insuline : le rôle d'*Igf1r* dans la détermination du testicule est démontré [199], ainsi que son rôle dans la survie des cellules de Sertoli (tout au moins en culture) [200]. *Grb10* pourrait donc être impliqué dans le phénotype de réduction du poids testiculaire pendant la phase de développement testiculaire, et plusieurs hypothèses de travail sont possibles : *Grb10* peut être anormalement surexprimé pendant le développement testiculaire de 97C (à l'état adulte, il n'y a pas de différence de niveau d'expression) ; une autre possibilité serait que l'allèle *spretus* soit hypermorphe. Cette seconde hypothèse est moins probable, car le transcriptome du testicule de 97C ne montre pas de perturbation compatible avec une dérégulation de la voie de l'insuline à l'état adulte. De plus, *97Crc11c* ne présente pas de phénotype autre que celui affectant le testicule, alors que *Grb10* est un gène exprimé dans de nombreux tissus (par exemple, le poids corporel de 97C est comparable au témoin). Il faudrait donc imaginer un effet restreint au testicule via un hypothétique transcrite testiculaire, ou une régulation testiculaire particulière de *Grb10*.

- *Figl1* (fidgetin like 1) est un gène de la famille des protéines AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities), présentant des homologies de séquence avec le gène de la *Fidgetin*. *Figl1* est exprimé notamment dans le thymus, les os, l'embryon en développement, l'ovocyte et le testicule (d'après SymAtlas). Dans le testicule, les cellules de Sertoli, ainsi que les spermatocytes l'expriment. Les spermatocytes sont la source principale de son expression dans le tissu adulte, cependant, dans le testicule prénatal et pré-pubère, le gène est aussi exprimé (d'après GermOnline). Il semblerait que ce gène intervienne dans la régulation de la prolifération cellulaire des cellules osseuses [201]. Il est possible que la *fidgetin-like1* intervienne aussi dans les processus de prolifération cellulaire du testicule en développement. Il pourrait donc intervenir dans le phénotype de réduction du poids testiculaire de 97C.

- *Zpbp1* est un gène impliqué dans la biogenèse de l'acrosome ainsi que dans la morphogénèse globale du spermatozoïde. Comme nous l'avons vu précédemment, son invalidation conduit à des défauts majeurs dans les structures du gamète mâle [195]. Cependant, le phénotype de tératozoospermie des mâles 97C présente des différences importantes comparé au phénotype des mâles *Zpbp1*^{-/-}.

- *4930415F15Rik* est une séquence fortement exprimée dans le testicule. Son expression apparaît testiculaire spécifique et post-méiotique chez la souris (Figure 39).

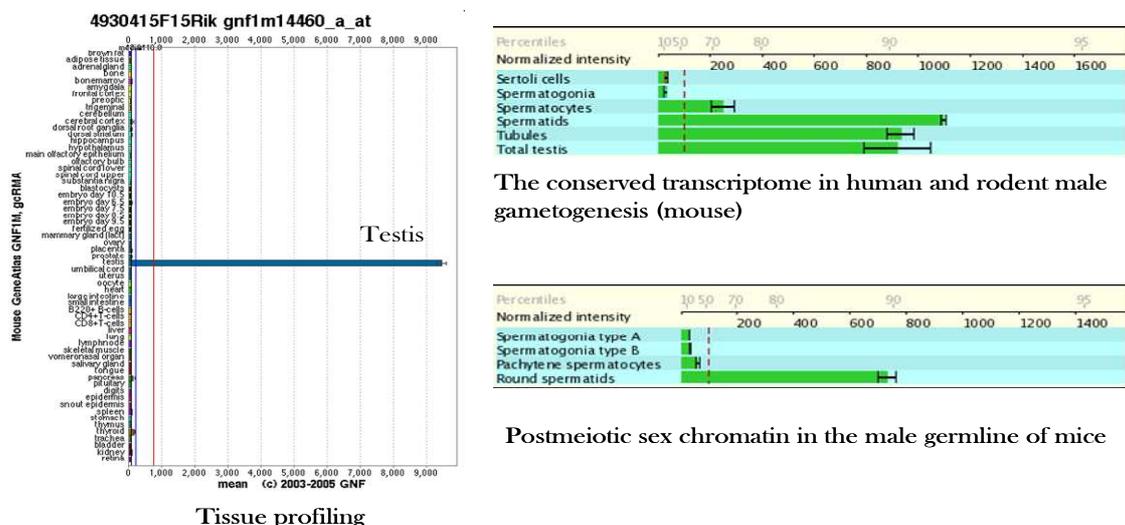


Figure 39 Données bioinformatiques sur le gène 4930415F15Rik.

La base de données SymAtlas montre que le gène a une expression testiculaire spécifique chez la souris. La base de données GermOnline répertorie deux études qui montrent une expression post-méiotique de ce gène.

Il y a une bonne conservation de la protéine entre l'homme et la souris puisque la séquence présente environ 75% d'homologie. La base Ensembl répertorie des orthologues dans 25 espèces animales (24 mammifères et un reptile). L'interrogation de l'ensemble des bases de données des séquences protéiques par un blast réciproque permet de suggérer l'existence d'orthologues chez la Cione (Ascidie) et l'Amphioxus (Céphalocordés). Ces arguments sont en faveur d'un rôle important dans le testicule. Ce rôle reste toutefois à déterminer.

Nous recherchons actuellement des polymorphismes dans les séquences des allèles *spretus* de ces quatre gènes afin de juger de leur implication potentielle dans les phénotypes testiculaires de 97C.

A. ***Etude du transcriptome testiculaire dans le contexte du mosaïcisme interspécifique***

1. Introduction et résumé de l'article

i Mosaïcisme génomique

Les lignées IRCS ont des génomes mosaïques interspécifiques, puisque des fragments d'origine *spretus* ont été introgressés dans un fond génétique *Mus musculus*, à l'état homozygote. Le mosaïcisme génomique n'est pas une spécificité des lignées d'introgression (RIS, RCS CSS) ; en effet, plusieurs études [202-204] montrent que le génome des lignées classiques de souris de laboratoire, ainsi que celui des souris dérivées de souris sauvages, présentent un mosaïcisme génomique inter-sub-spécifique : le génome des lignées classiques présente des régions génomiques d'origine *Mus musculus domesticus* en grande majorité (~92%), mais aussi des régions d'origine *Mus musculus musculus* (~7%) et *castaneus* (~1%) [204]. Comme ces introgressions inter-sub-spécifiques concernent aussi les lignées de laboratoire dérivées récemment de souris sauvages, il semble que le mosaïcisme génomique chez la souris soit fréquent.

Des études ont montré que ce phénomène n'était pas restreint au genre *Mus*, des introgressions inter-sub-spécifiques ont été retrouvées dans les genres *Bos* [205, 206], et *canis* [207, 208] par exemple.

Les lignées IRCS constituent un modèle intéressant pour étudier les génomes mosaïques interspécifiques, car, d'une part, la distinction de la provenance des allèles peut être faite sans ambiguïté, et d'autre part, l'introgression des fragments *spretus* s'est faite dans des proportions similaires à ce qui peut être observé naturellement.

ii Régulation transcriptionnelle dans le contexte interspécifique

La façon dont les gènes sont régulés lorsqu'ils sont introduits dans un nouvel environnement génomique est mal connue. Des études transcriptomiques ont été conduites sur des ARN de tissus extraits de lignées appartenant à différentes espèces ou sous-espèces de souris [209] ainsi que sur des ARN de tissus extraits d'hybrides (F1) inter-sub-spécifiques [210]. L'équipe de R. Woolstra a étudié le niveau d'expression des gènes dans le testicule, le cerveau, le foie et le rein, pour des individus appartenant aux espèces *Mus musculus domesticus*, *M. m. musculus*, *M. m. castaneus* et *Mus spretus*. Des comparaisons pour chaque tissu ont été conduites au niveau intraspécifique (entre les sous-espèces du genre *Mus musculus*) et au niveau interspécifique (entre *Mus musculus* et *Mus spretus*). Ces comparaisons ont montré une plus grande divergence entre les niveaux d'expression en interspécifique qu'en intraspécifique, et que le testicule était le tissu présentant le plus de gènes différemment exprimés. Une étude similaire a été conduite entre l'homme et le chimpanzé, montrant que le testicule encore une fois comportait le plus de gènes différemment exprimés entre les deux espèces [211]. Ces deux études corroborent l'idée que les gènes testiculaires, en particulier, sont des cibles privilégiées de l'évolution. Ces études transcriptomiques suggèrent que la régulation des gènes testiculaires évolue plus rapidement que celle des gènes « somatiques ».

Ce phénomène d'évolution rapide a déjà été décrit au niveau de la séquence protéique des gènes d'expression spécifiquement testiculaire [212] et plus particulièrement pour les gènes d'expression post-méiotique (dans la spermatide) [213].

Ces études, conduites sur les différentes espèces, ne donnent pas accès au niveau d'incompatibilité interspécifique génomique que ces différences d'expression produisent. R. Rottscheidt et son équipe ont conduit une étude transcriptionnelle sur les mêmes tissus que dans l'étude de Woolstra, extraits d'individus issus de croisements inter-sub-spécifiques impliquant *Mus musculus domesticus*, *M. m. musculus* et *M. m. castaneus*. Les auteurs ont conclu dans cette étude que le niveau d'expression génique dans la F1 était égal à la moyenne de celle des deux parents pour la plupart des gènes sur l'ensemble des tissus analysés (comportement dit « additif »). Cependant pour le croisement *M. m. domesticus* × *M. m. castaneus*, les auteurs montrent que la proportion des gènes dont l'expression a un comportement non-additif, augmente fortement (environ 50%), dans le testicule spécifiquement. Ce croisement correspond à celui pour lequel divergence phylogénétique entre les deux parents est la plus prononcée, et donc, est celui qui s'approche le plus d'un croisement interspécifique.

iii But de notre étude : IRCS et régulation génique interspécifique

Afin de trouver des gènes de fertilité mâle, nous avons étudié le transcriptome testiculaire de trois lignées IRCS et des lignées parentales B6 et SEG. Trois lignées ont été choisies car elles présentaient des phénotypes testiculaires originaux, montrant une incompatibilité entre les fragments génomiques *spretus* et le fond génétique *musculus*. Ces lignées sont : les deux lignées 97C et 44H présentées en II.A.2.a, auxquelles nous avons ajouté la lignée 137F, présentant un phénotype de SCO (Sertoli Cell Only) partiel.

Cette dernière lignée porte trois fragments *spretus*, sur MMU1, MMU6 et MMU19 (en partie partagé par 44H) (voir dans l'article 1). Au cours de l'étude du transcriptome de ces trois lignées, il nous est apparu que nous disposions d'un modèle précieux pour étudier le transcriptome dans un génome mosaïque interspécifique.

1er Enrichissement des fragments *spretus* en gènes différemment exprimés

Dans un premier temps, nous avons étudié les données transcriptomiques lignée par lignée, en comparant les IRCS testées et le parent SEG avec les données du transcriptome du parent B6. Nous avons fixé le seuil de différence d'expression à 4 fois. Les résultats sont résumés dans le tableau 7. Le pourcentage de gènes différemment exprimés entre les lignées IRCS et le parent B6 est approximativement proportionnel au pourcentage de génome *spretus* introgressé dans chaque lignée.

Tableau 7 Gènes différemment exprimés dans le testicule des lignées SEG, 44H, 137F et 97C.

Lignée	SEG	44H	137F	97C
Nombre de fragments <i>spretus</i>		7	3	1
% de gènes différemment régulés par rapport à B6	20,89	0,23	0,18	0,09
Proportion de gènes sous-exprimés	48	75	25	93

Nous avons souhaité étudier la répartition des gènes modifiés dans le génome des lignées, pour détecter d'éventuels regroupements de gènes modifiés. Pour ce faire, nous avons mesuré le niveau de modification expressionnelle sur des fenêtres de 50 gènes, glissant le long des chromosomes. La formalisation mathématique de cette étude de « clustering » cartographique est donnée dans l'article 2. Cette étude nous a permis de détecter un regroupement des gènes présentant une modification expressionnelle à l'intérieur des fragments *spretus* (Figure 40).

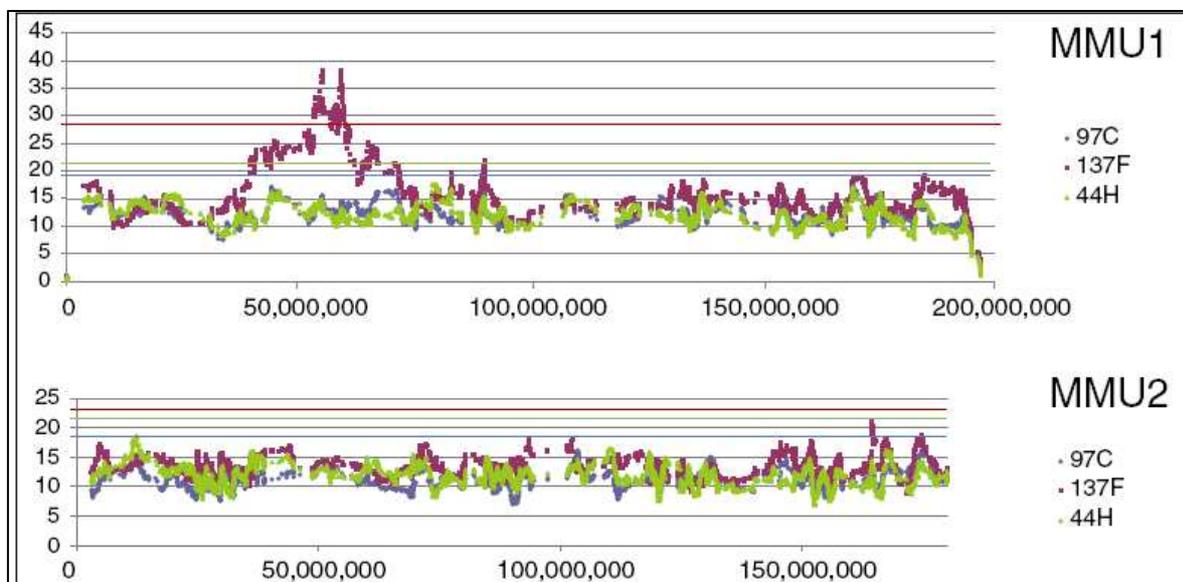


Figure 40 Mesure du niveau de modification expressionnelle sur des fenêtres de 50 gènes en fonction de la position le long de deux chromosomes, MMU1 et MMU2 pour les trois lignées IRCS.

Pour chaque lignée, un seuil de significativité du clustering cartographique a été défini. Sur le chromosome 1, on remarque que le niveau de modification expressionnelle dépasse le seuil pour la lignée 137F, à la position du fragment *spretus* de la lignée. Pour le chromosome 2, sur lequel il n'y a pas de fragment *spretus* pour les lignées étudiées, le niveau ne dépasse pas les seuils.

Ainsi, les données expressionnelles permettent de repérer l'emplacement des fragments *spretus*. Cependant, nous avons observé deux écarts par rapport à la carte génétique des lignées : pour la lignée 44H, nous n'avons pas pu détecter les fragments sur les chromosomes 15 et 16, et pour la lignée 97C, nous avons détecté un clustering cartographique sur le chromosome 6, placé entre deux marqueurs d'allèle B6.

Nous avons typé un ensemble de microsatellites dans ces régions, et nous avons montré la présence d'un fragment *spretus* jusqu'alors non détecté sur MMU6 pour 97C et l'absence effective de fragment sur MMU15 et MMU16 pour 44H.

Nous n'avons donc pas trouvé de regroupement cartographique de gènes expressionnellement modifiés en dehors des fragments *spretus*. L'analyse transcriptionnelle du testicule des lignées IRCS a permis d'affiner les données cartographiques existantes.

2e Etude du comportement expressionnel des gènes dans les fragments *spretus*

Afin d'étudier le comportement expressionnel des gènes *spretus* dans le fond *musculus*, nous avons considéré l'ensemble des fragments *spretus* des trois lignées IRCS comme un tout (n=2320). Les comparaisons ont été conduites en calculant les corrélations totales et partielles entre les niveaux d'expression pour B6, SEG et les IRCS, au niveau de la totalité des gènes, puis au niveau des gènes situés dans les fragments, et enfin au niveau seul des gènes dont l'expression est modifiée par rapport à B6 dans les fragments.

Lorsque l'on compare les données transcriptomiques au niveau des gènes des fragments *spretus* différemment exprimés entre B6 et les IRCS, on observe une corrélation spécifique significative entre les transcriptome de SEG et des IRCS. Ceci montre que la proportion des gènes qui conservent un profil d'expression de type *spretus* est importante parmi les gènes modifiés (~75%).

Considérant les gènes des fragments *spretus*, nous avons défini quatre classes de gènes en fonction de leur comportement expressionnel, résumé dans la figure 41 :

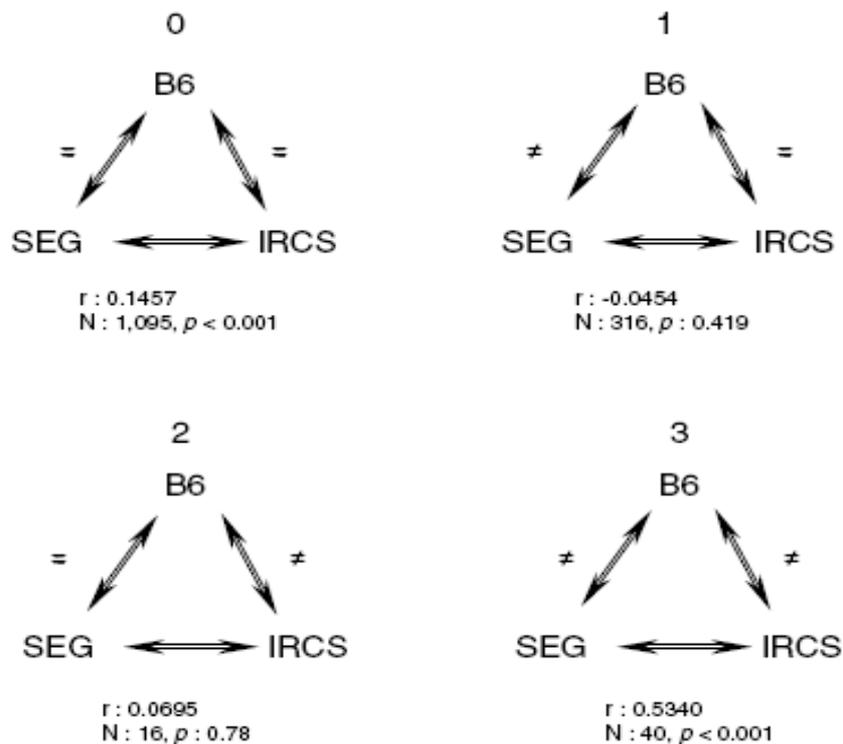


Figure 41 Classification des gènes des fragments *spretus* en fonction de leur comportement expressionnel :

Classe 0 : gènes dont l'expression est identique dans les lignées B6, SEG et IRCS (75% des gènes)

Classe 1 : gènes dont l'expression est différente entre B6 et SEG et qui montrent une expression de type B6 quand ils sont introgressés dans le fond B6 (21% des gènes)

Classe 2 : gènes dont l'expression est identique entre B6 et SEG et qui montrent une modification de leur expression par rapport à B6 quand ils sont introgressés dans le fond B6 (1% des gènes)

Classe 3 : gènes dont l'expression est différente entre B6 et SEG et qui montrent une modification de leur expression par rapport à B6 quand ils sont introgressés dans le fond B6 (3% des gènes).

- Les gènes *spretus* de la classe 0 ont une expression non significativement différente dans les deux espèces *Mus musculus* et *spretus*, et sont correctement régulés dans les IRCS, ils représentent la majorité des gènes.
- Les gènes *spretus* de la classe 1 se comportent comme leur homologue B6, il y a dominance du fond génétique B6 (au sens défini par Rottscheidt).
- Les gènes *spretus* de la classe 2 sont des gènes régulés au même niveau d'expression dans les deux espèces *Mus musculus* et *spretus*, cependant, quand ils sont introgressés d'un fond *spretus* vers un fond *musculus*, ces gènes ne se comportent ni comme leur homologue B6, ni

comme quand ils étaient dans leur fond génétique *spretus* d'origine. Ces gènes sont en fait majoritairement fortement sous-exprimés.

- Pour les gènes de la classe 3, on note une corrélation spécifique significative entre leurs niveaux expressionnels dans la lignée SEG et dans les IRCS, il y a donc dominance du parent SEG pour la plus part des gènes de cette catégorie.

3e Association des altérations des niveaux d'expression avec un polymorphisme génétique élevé dans le promoteur des gènes

Nous avons voulu déterminer si la modification d'expression des gènes des classes 2 et 3 était liée à des différences dans la séquence des promoteurs de ces gènes. Nous avons séquencé les promoteurs de 24 gènes situés dans les fragments *spretus*, se répartissant en 19 gènes modifiés appartenant aux classes 2 et 3, et 5 gènes non modifiés appartenant à la classe 0. Nous avons trouvé une fréquence de polymorphismes plus élevée dans les promoteurs des gènes des classes 2 et 3 que dans les promoteurs des gènes de la classe 0 (2.7% vs 1.1%, $p=0.008$).

L'ensemble des résultats de cette étude est détaillé dans l'article 2.

2. Discussion et Conclusion de l'article 2

Les études des modulations du transcriptome dans le cas d'interaction entre deux génomes d'origines différentes ont été conduites essentiellement en exploitant des hybrides inter-sub-spécifiques, dans les espèces animales et végétales. Nous avons étudié le transcriptome testiculaire de trois lignées aux génomes mosaïques interspécifiques.

Alors que Rottscheidt dans son étude sur des hybrides inter-sub-spécifiques a montré que l'additivité était le type de dérégulation de l'expression des gènes le plus fréquent, nous avons essentiellement détecté des comportements de dominance ou de sur-dominance (classe 2 et 3). Cette différence peut être expliquée de deux façons.

(1) Dans nos travaux, la divergence *spretus-musculus* est beaucoup plus forte que la divergence existant entre les sous-espèces utilisées dans l'étude de Rottscheidt. Il est intéressant de noter que, dans cette même étude, la règle de l'additivité ne s'applique plus pour le croisement le plus divergent.

(2) Le modèle IRCS présente des fragments à l'état homozygote alors que les hybrides juxtaposent deux hémi-génomes : les variants alléliques des facteurs de transcriptions (*trans*) ainsi que les variants alléliques des promoteurs cibles (*cis*) sont tous présents. L'introgression de fragment à l'état homozygote permet d'accentuer les effets, puisque les facteurs transcriptionnels et les séquences promotrices cibles ont le plus souvent des origines génétiques différentes.

Nous avons proposé différents mécanismes pour expliquer le mode de régulation des gènes des différentes classes (Figure 42) :

- Pour les gènes de la classe 1, qui montrent un profil d'expression de type B6, différent de leur profil allélique *spretus*, des facteurs *trans* issus du fond génétique B6 jouent de façon majoritaire sur leur expression (figure 42 d).

- Pour la majorité des gènes de la classe 3, le mode de régulation est introgressé en même temps que la séquence codante, puisque ces gènes montrent un niveau d'expression comparable à celui qu'ils ont dans le parent SEG quand ils sont introgressés dans un fond B6. Il est probable que les éléments *cis* de leurs promoteurs jouent de façon primordiale sur leur régulation expressionnelle (figure 42 e).

- Concernant les gènes de la classe 2, parmi lesquels 80% sont transcriptionnellement éteints, il existe une incompatibilité entre les éléments *trans* B6 et les éléments *cis* SEG (figure 42 f). L'évolution a probablement maintenu le niveau expressionnel de ces gènes constant entre B6 et SEG, par contre les mécanismes de leur régulation ont divergé (par des processus de compensation *cis trans* différents entre B6 et SEG). Les gènes de cette classe sont les moins nombreux (~1%), leur présence est probablement délétère pour le bon fonctionnement testiculaire et donc pour la survie des lignées.

- Dans le fond génétique B6 des lignées IRCS, il existe des gènes dont l'expression n'est pas identique à B6 : il est probable qu'un (ou plusieurs) facteur transcriptionnel issu d'un fragment *spretus* module leur expression (figure 43 c). Ces gènes sont peu nombreux, et présentent des variations d'expression modestes, ceci s'explique probablement par le faible effet relatif des facteurs transcriptionnels issus des fragments *spretus* (un gène étant régulé par plusieurs facteurs *trans*).

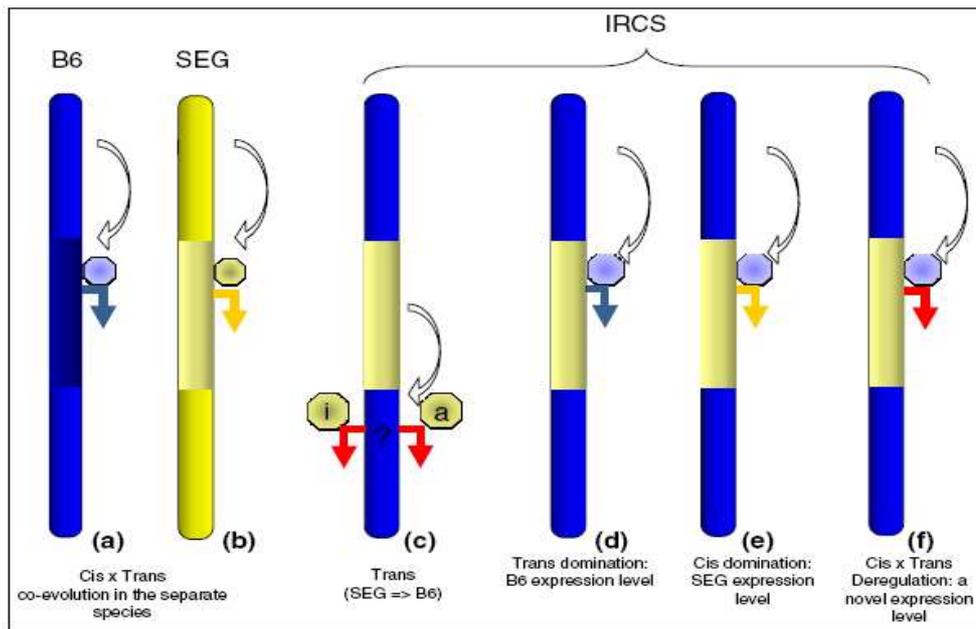


Figure 42 Mécanismes possibles de régulation des gènes *spretus* dans le fond génétique B6

a) et b) Régulation expressionnelle dans le fond génétique d'origine.

c) la présence d'un élément *cis spretus* dans le génome IRCS peut moduler la transcription de gène du fond B6

d) Pour une partie majoritaire des gènes du fragment, les facteurs *cis* B6 régulent l'expression des gènes de « façon B6 ».

e) Certains gènes sont régulés comme dans le parent SEG, les facteurs *cis spretus* ont un effet dominant sur leur régulation.

f) Lorsque les éléments *cis spretus* et *trans* B6 sont incompatibles, la régulation du gène est défectueuse.

En conclusion, dans cette étude, nous avons pu montrer que le mode de régulation des gènes dans un génome mosaïque était aisément identifiable en utilisant l'outil IRCS. Nous avons observé que la majeure partie des gènes introgressés était régulée normalement par le fond génétique B6. Certains gènes introgressés montrent toutefois une régulation identique à celle retrouvée dans le génome donneur, probablement due à des éléments *cis* différents. D'autres gènes, en faible proportion, sont totalement dérégulés, du fait d'incompatibilité *cis-trans* (c'est-à-dire, des incompatibilités entre les éléments de réponses des promoteurs et les facteurs transcriptionnels qui se fixent normalement sur ces éléments).

Pour ces deux catégories de gènes, nous avons trouvé significativement plus de variations de séquence dans leur promoteur que dans le promoteur des gènes non dérégulés. Ces deux catégories de gènes, représentant environ 5% des gènes des fragments, participent probablement à l'étiologie des défauts de fertilité des lignées IRCS.

Dans ce travail, nous n'avons étudié que les anomalies d'expression des gènes, mais des variations de séquence entre B6 et SEG existent aussi dans les parties codantes des gènes. Ces variations jouent probablement un rôle important dans la dynamique de constitution d'un génome mosaïque interspécifique, ainsi que dans la pathogenèse des défauts de fertilité des lignées. Les processus de rupture d'épistasie que nous avons pu observer au niveau expressionnel (notamment pour les gènes de la classe 2) prennent probablement aussi place au niveau de l'interactome protéique, en introduisant des incompatibilités d'interaction entre hétérodimères par exemple.

3. Article 2

Gene expression regulation in the context of mouse interspecific mosaic genomes.

III. Conclusion générale et perspectives

Mon travail de thèse a été l'occasion de commencer *de novo* un projet de cartographie de QTL de fertilité mâle chez la souris. De nombreux QTL influençant des paramètres de la fertilité mâle avaient déjà été positionnés le long du génome de la souris, cependant, aucun n'avait été jusqu'à présent disséqué suffisamment finement pour dévoiler ses bases moléculaires. J. Flint a montré dans un travail bibliographique, que les QTL pour lesquels un clonage positionnel avait été possible, étaient des QTL expliquant une part importante de la variance phénotypique [185]. Les paramètres de fertilité sont connus pour avoir une héritabilité faible [214-216], or la puissance de détection d'un QTL est liée, en partie, à son héritabilité.

Nous avons mis à profit le set de lignées IRCS, un outil original créé à l'Institut Pasteur par X. Montagutelli et J.L. Guénet, afin de positionner de nouveaux QTL de fertilité mâle, mais surtout de parvenir enfin à cloner de nouveaux gènes intervenant de façon quantitative dans la fertilité. L'utilisation des IRCS pour la primo-localisation présente plusieurs avantages : les génotypes étant établis sous forme de lignées, les phénotypes peuvent être étudiés avec répétition contrairement à la primo-localisation de QTL en population F2 par exemple, où chaque individu est unique. Cette caractéristique permet d'une part de réduire la variance phénotypique, mais aussi les biais environnementaux. D'autre part, il est possible d'étudier finement un phénotype, en réalisant un panel d'expériences sur des animaux différents, mais de même génotype. Un second avantage, plus spécifique des IRCS, est le fort polymorphisme phénotypique des lignées (probablement lié à la fréquence des variations de séquence élevée entre B6 et SEG).

Ainsi, la primo-localisation de QTL dans le modèle IRCS nous a permis d'identifier un ensemble de lignées présentant des déviations phénotypiques importantes par rapport à la lignée B6 et de positionner 8 QTL influençant des paramètres de la fertilité mâle.

Nous avons choisi d'étudier deux lignées IRCS présentant les déviations les plus fortes. Afin d'étudier les bases génétiques de la forte tératozoospermie de la lignée 44H, qui porte 6 fragments *spretus*, nous avons employé plusieurs approches complémentaires. Nous avons analysé le transcriptome testiculaire de cette lignée afin de trouver des gènes candidats. De nombreux gènes ont montré une perturbation de leur profil d'expression. Une première analyse bibliographique des gènes dérégulés nous a permis de proposer le gène de l'*Espin* comme gène candidat. Malgré la pertinence du raisonnement, nous avons démontré, par une approche cartographique et par l'étude d'un mutant de ce gène, que l'*Espin* n'était pas impliqué dans le phénotype. Cet exemple montre que l'approche cartographique est indispensable pour valider ou infirmer un gène candidat dans le modèle IRCS. A ce jour, l'analyse cartographique se poursuit sur trois des fragments de 44H. L'analyse phénotypique fine en microscopie électronique de 44H a permis de montrer une anomalie de l'étalement de la matrice de l'acrosome dans la spermatide ronde, associée à des irrégularités du noyau au pôle apical qui pourraient être à l'origine de la tératozoospermie. Le défaut de l'acrosome disparaît pendant la maturation de la spermatide, expliquant pourquoi l'analyse morphologique et fonctionnelle de l'acrosome des spermatozoïdes épидидymaires n'avait pas permis de détecter d'anomalie acrosomique à ce stade. L'originalité du phénotype de tératozoospermie de 44H et l'absence de gène candidat évident suggèrent que le processus qui est altéré lors de la spermiogenèse est un processus moléculaire qui n'a encore jamais été décrit.

Par ailleurs, par les mêmes approches, nous avons étudié la lignée 97C présentant une réduction du poids testiculaire, une tératozoospermie modérée, et un aspect atypique des vésicules séminales. L'approche cartographique pour cette lignée a permis de localiser deux QTL distincts :

- un QTL impliqué dans la composition des sécrétions séminales sur le chromosome 6,
- un QTL impliqué dans le développement testiculaire associé à une tératozoospermie modérée sur le chromosome 11. Nous avons montré que la réduction du poids testiculaire entre 97C et B6 était observable à partir de la mise en place de la spermiogenèse, et qu'elle n'impliquait pas d'anomalie structurelle de l'épithélium germinatif. Les données du transcriptome testiculaire, ainsi que le développement apparemment normal des glandes androgéno-dépendantes, suggèrent une bonne imprégnation hormonale de l'ensemble du tractus génital mâle des individus 97Crc11, et donc que le défaut de croissance du testicule n'est pas un hypogonadisme hypogonadotrope.

Nous avons effectué une analyse en cartographie fine du QTL sur le chromosome 11 en établissant un ensemble de lignées recombinantes pour ce fragment *spretus*. Cette analyse, encore en cours, nous permet à présent de proposer une région de 10 gènes comme région QTL candidate aux phénotypes testiculaires de 97C. Parmi ces 10 gènes, 4 sont exprimés dans le testicule. Les autres gènes ne montrent pas une expression testiculaire détectable, et ne sont pas non plus exprimés dans l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les gènes : *Grb10*, *Figl1*, *4930415F15Rik* et *Zbp1* constituent les meilleurs gènes candidats de cette région QTL. La région QTL étant impliquée dans deux phénotypes, il est possible qu'elle contienne deux gènes testiculaires chacun responsable d'un des phénotypes, ou alors un seul gène impliqué dans des problématiques de développement testiculaires et de maturation de la lignée germinale. Dans ce dernier cas, le phénotype de tératozoospermie modérée peut aussi être un phénotype secondaire lié à une perturbation non spécifique du fonctionnement testiculaire.

Actuellement, nous séquençons ces 4 gènes afin de voir si nous pouvons associer un polymorphisme génétique et le phénotype testiculaire pour l'un de ces gènes. Si l'un de ces gènes présente des variations de séquence potentiellement fonctionnelles, nous effectuerons une étude d'association en population humaine et en population bovine sur le critère phénotypique de faible circonférence scrotale et de tératozoospermie.

La preuve définitive de l'implication d'un de ces gènes dans les phénotypes de réduction du poids testiculaires et/ou de tératozoospermie implique soit la création d'une lignée congénique contenant uniquement ce gène (la probabilité d'occurrence des recombinaisons efficaces étant extrêmement faible dans un intervalle peu étendu, il est difficile d'obtenir une telle lignée) soit la création d'un modèle de souris Knock-In de l'allèle *spretus* dans le fond musculus (remplacement par recombinaison homologue de l'allèle musculus par l'allèle *spretus*). Cette dernière expérience, coûteuse en temps et en moyen, ne pourrait être conduite que si un faisceau de preuves indirectes suffisant venait corroborer l'implication potentielle du gène candidat dans le phénotype.

Lors de ces travaux de thèse, nous avons voulu effectuer des analyses qui permettraient d'arriver plus rapidement au gène candidat. Nous avons donc choisi d'analyser les transcriptomes testiculaires des lignées d'intérêt avec l'idée que les gènes dérégulés des fragments constitueraient de bons gènes candidats, ou que les gènes dérégulés du fond génétique B6 des lignées IRCS, nous permettraient, par clustering fonctionnel, de remonter vers un gène contenu dans un fragment *spretus*. Aucune de ces deux hypothèses ne s'est avérée exacte : le nombre de gènes dérégulés dans les fragments est important, et rend impossible le choix d'un candidat, et les gènes dérégulés du fond génétique n'appartiennent pas aux mêmes familles fonctionnelles. **Rétrospectivement**, ces résultats ne sont pas surprenants : d'une part, des études sur la régulation génique en contexte interspécifique démontrent qu'environ 10% des gènes sont dérégulés ; d'autre part, le clustering fonctionnel des gènes dérégulés du fond génétique nécessite pour exister qu'un facteur transcriptionnel important pour la fonction testiculaire et présent sous une forme allélique *spretus*, ne puisse pas assurer sa fonction correctement. Or nous avons choisi d'étudier des lignées aux caractéristiques phénotypiques extrêmes, mais toutefois fertiles.

Leur fonction testiculaire n'est donc pas gravement perturbée, ce qui rend peu probable une dérégulation massive en *trans* du transcriptome testiculaire.

L'analyse du transcriptome testiculaire des lignées IRCS et des lignées parentales B6 et SEG, nous a cependant permis d'amorcer une réflexion intéressante sur la régulation génique dans le contexte d'un génome mosaïque interspécifique. Pour poursuivre cette réflexion, l'analyse du transcriptome testiculaire de l'ensemble des lignées IRCS permettrait d'obtenir une cartographie parfaite du set des IRCS, mais aussi, probablement de trouver des eQTL (QTL impliqués dans la régulation de l'expression des gènes) régulant la fonction testiculaire et enfin, d'intégrer l'analyse transcriptomique au niveau génomique. Ceci devrait permettre de mieux comprendre la tolérance d'un génome vis-à-vis des flux de gènes, et donc d'obtenir de nouvelles données sur les mécanismes moléculaires de la spéciation.

IV. Références

1. Luo X, Ikeda Y, Parker KL: **A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation.** *Cell* 1994, **77**(4):481-490.
2. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL *et al*: **The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation.** *Nature* 2000, **403**(6772):909-913.
3. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S: **Defects of urogenital development in mice lacking Emx2.** *Development* 1997, **124**(9):1653-1664.
4. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R: **WT-1 is required for early kidney development.** *Cell* 1993, **74**(4):679-691.
5. Laissue P, L'Hote D, Serres C, Vaiman D: **Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters.** *Animal* 2008, **3**(1):55-71.
6. Roscoe B, Little CC, Snell GD, Dingle JH: **Biology of the Laboratory Mouse:** Philadelphia, The Blakiston company; 1941.
7. Russell LD, Lonnie DR, Ettlin R: **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis:** Cache River Press; 1990.
8. Maatouk DM, Capel B: **Sexual development of the soma in the mouse.** *Curr Top Dev Biol* 2008, **83**:151-183.
9. Toshimori K, Ito C: **Formation and organization of the mammalian sperm head.** *Arch Histol Cytol* 2003, **66**(5):383-396.
10. Gilbert SF: **Developmental Biology, 6th Edition:** Sinauer Associates, INC.; 2000.
11. Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M: **Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization.** *J Cell Biol* 1977, **74**(1):68-85.
12. Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE: **KSper, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(18):7688-7692.
13. Abou-Haila A, Tulsiani DR: **Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function.** *Arch Biochem Biophys* 2000, **379**(2):173-182.
14. Kato A, Nagata Y, Todokoro K: **Delta-tubulin is a component of intercellular bridges and both the early and mature perinuclear rings during spermatogenesis.** *Dev Biol* 2004, **269**(1):196-205.
15. Vogl AW, Pfeiffer DC, Mulholland D, Kimel G, Guttman J: **Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations.** *Arch Histol Cytol* 2000, **63**(1):1-15.
16. de Rooij DG: **Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells.** *Reproduction* 2001, **121**(3):347-354.
17. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A: **Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989).** *Hum Reprod* 1991, **6**(6):811-816.
18. Jouannet P, Wang C, Eustache F, Kold-Jensen T, Auger J: **Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline.** *APMIS* 2001, **109**(5):333-344.
19. Royal M, Mann GE, Flint AP: **Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle.** *Vet J* 2000, **160**(1):53-60.
20. Sharpe RM, Franks S: **Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue.** *Nat Cell Biol* 2002, **4 Suppl**:s33-40.
21. Matzuk MM, Lamb DJ: **The biology of infertility: research advances and clinical challenges.** *Nat Med* 2008, **14**(11):1197-1213.

22. Matzuk MM, Lamb DJ: **Genetic dissection of mammalian fertility pathways.** *Nat Cell Biol* 2002, **4 Suppl**:s41-49.
23. Roy A, Matzuk MM: **Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways.** *Reproduction* 2006, **131**(2):207-219.
24. Iguchi N, Tobias JW, Hecht NB: **Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(20):7712-7717.
25. Chalmel F, Rolland AD, Niederhauser-Wiederkehr C, Chung SS, Demougin P, Gattiker A, Moore J, Patard JJ, Wolgemuth DJ, Jegou B *et al*: **The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(20):8346-8351.
26. Baker MA, Hetherington L, Reeves GM, Aitken RJ: **The mouse sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification.** *Proteomics* 2008, **8**(8):1720-1730.
27. Huang XY, Guo XJ, Shen J, Wang YF, Chen L, Xie J, Wang NL, Wang FQ, Zhao C, Huo R *et al*: **Construction of a proteome profile and functional analysis of the proteins involved in the initiation of mouse spermatogenesis.** *J Proteome Res* 2008, **7**(8):3435-3446.
28. Huyghe E, Izard V, Rigot JM, Pariente JL, Tostain J: **[Optimal evaluation of the infertile male. 2007 French urological association guidelines].** *Prog Urol* 2008, **18**(2):95-101.
29. Marengo SR: **Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane.** *Anim Reprod Sci* 2008, **105**(1-2):52-63.
30. Murer V, Spetz JF, Hengst U, Altrogge LM, de Agostini A, Monard D: **Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(6):3029-3033.
31. Peitz B: **Effects of seminal vesicle fluid components on sperm motility in the house mouse.** *J Reprod Fertil* 1988, **83**(1):169-176.
32. Yoshida K, Kawano N, Yoshiike M, Yoshida M, Iwamoto T, Morisawa M: **Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans.** *Mol Hum Reprod* 2008, **14**(3):151-156.
33. Luo CW, Lin HJ, Chen YH: **A novel heat-labile phospholipid-binding protein, SVS VII, in mouse seminal vesicle as a sperm motility enhancer.** *J Biol Chem* 2001, **276**(10):6913-6921.
34. Molina J, Castilla JA, Gil T, Hortas ML, Vergara F, Herruzo A: **Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry.** *Hum Reprod* 1995, **10**(5):1280-1286.
35. Kawano N, Yoshida M: **Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility.** *Biol Reprod* 2007, **76**(3):353-361.
36. Robert M, Gibbs BF, Jacobson E, Gagnon C: **Characterization of prostate-specific antigen proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor/semenogelin I.** *Biochemistry* 1997, **36**(13):3811-3819.
37. Lundwall A, Peter A, Lovgren J, Lilja H, Malm J: **Chemical characterization of the predominant proteins secreted by mouse seminal vesicles.** *Eur J Biochem* 1997, **249**(1):39-44.
38. Chughtai B, Sawas A, O'Malley RL, Naik RR, Ali Khan S, Pentylala S: **A neglected gland: a review of Cowper's gland.** *Int J Androl* 2005, **28**(2):74-77.
39. Zhang JX, Rao XP, Sun L, Zhao CH, Qin XW: **Putative chemical signals about sex, individuality, and genetic background in the preputial gland and urine of the house mouse (*Mus musculus*).** *Chem Senses* 2007, **32**(3):293-303.

40. Simanainen U, McNamara K, Davey RA, Zajac JD, Handelsman DJ: **Severe subfertility in mice with androgen receptor inactivation in sex accessory organs but not in testis.** *Endocrinology* 2008, **149**(7):3330-3338.
41. Maekawa M, Kamimura K, Nagano T: **Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function.** *Arch Histol Cytol* 1996, **59**(1):1-13.
42. Weber JE, Russell LD, Wong V, Peterson RN: **Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli and Sertoli--germ-cell relationships.** *Am J Anat* 1983, **167**(2):163-179.
43. Brennan J, Tilmann C, Capel B: **Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad.** *Genes Dev* 2003, **17**(6):800-810.
44. Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A: **Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad.** *Development* 2003, **130**(16):3663-3670.
45. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A: **Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation.** *Development* 1990, **110**(2):521-528.
46. Lawson KA, Hage WJ: **Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse.** *Ciba Found Symp* 1994, **182**:68-84; discussion 84-91.
47. Koshimizu U, Watanabe D, Tajima Y, Nishimune Y: **Effects of W (c-kit) gene mutation on gametogenesis in male mice: agametic tubular segments in Wf/Wf testes.** *Development* 1992, **114**(4):861-867.
48. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R: **Expression of Sry, the mouse sex determining gene.** *Development* 1995, **121**(6):1603-1614.
49. Cool J, Carmona FD, Szucsik JC, Capel B: **Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the XY gonad.** *Sex Dev* 2008, **2**(3):128-133.
50. Brennan J, Karl J, Capel B: **Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad.** *Dev Biol* 2002, **244**(2):418-428.
51. Walsh PC, Madden JD, Harrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD: **Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias.** *N Engl J Med* 1974, **291**(18):944-949.
52. Bellve AR: **Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells.** *Methods Enzymol* 1993, **225**:84-113.
53. Nakatsuji N, Chuma S: **Differentiation of mouse primordial germ cells into female or male germ cells.** *Int J Dev Biol* 2001, **45**(3):541-548.
54. Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y: **Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis.** *Anat Rec* 2000, **258**(2):210-220.
55. Werner EA, DeLuca HF: **Metabolism of a physiological amount of all-trans-retinol in the vitamin A-deficient rat.** *Arch Biochem Biophys* 2001, **393**(2):262-270.
56. Clermont Y, Perey B: **Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats.** *Am J Anat* 1957, **100**(2):241-267.
57. Wang RA, Nakane PK, Koji T: **Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period.** *Biol Reprod* 1998, **58**(5):1250-1256.
58. Shaha C: **Modulators of spermatogenic cell survival.** *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007, **63**:173-186.
59. Dohle GR, Smit M, Weber RF: **Androgens and male fertility.** *World J Urol* 2003, **21**(5):341-345.
60. Tilbrook AJ, Clarke IJ: **Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males.** *Biol Reprod* 2001, **64**(3):735-742.

61. de Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP: **The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology.** *Mol Cell Endocrinol* 2004, **225**(1-2):57-64.
62. Zhang FP, Pakarainen T, Zhu F, Poutanen M, Huhtaniemi I: **Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice.** *Endocrinology* 2004, **145**(3):1453-1463.
63. O'Shaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ: **Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice.** *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 17):3491-3496.
64. Abel MH, Baban D, Lee S, Charlton HM, O'Shaughnessy PJ: **Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse.** *J Mol Endocrinol* 2009, **42**(4):291-303.
65. Sadate-Ngatchou PI, Pouchnik DJ, Griswold MD: **Identification of testosterone-regulated genes in testes of hypogonadal mice using oligonucleotide microarray.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(2):422-433.
66. Denolet E, De Gendt K, Allemeersch J, Engelen K, Marchal K, Van Hummelen P, Tan KA, Sharpe RM, Saunders PT, Swinnen JV *et al*: **The effect of a sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice.** *Mol Endocrinol* 2006, **20**(2):321-334.
67. O'Shaughnessy PJ, Abel M, Charlton HM, Hu B, Johnston H, Baker PJ: **Altered expression of genes involved in regulation of vitamin A metabolism, solute transportation, and cytoskeletal function in the androgen-insensitive tfm mouse testis.** *Endocrinology* 2007, **148**(6):2914-2924.
68. Eacker SM, Shima JE, Connolly CM, Sharma M, Holdcraft RW, Griswold MD, Braun RE: **Transcriptional profiling of androgen receptor (AR) mutants suggests instructive and permissive roles of AR signaling in germ cell development.** *Mol Endocrinol* 2007, **21**(4):895-907.
69. De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C *et al*: **A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(5):1327-1332.
70. Ritzen EM, French FS: **Demonstration of an androgen binding protein (ABP) in rabbit testis: secretion in efferent duct fluid and passage into epididymis.** *J Steroid Biochem* 1974, **5**(2):151-154.
71. Kluin PM, de Rooij DG: **A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse.** *Int J Androl* 1981, **4**(4):475-493.
72. de Rooij DG, Russell LD: **All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask.** *J Androl* 2000, **21**(6):776-798.
73. Kierszenbaum AL, Gil M, Rivkin E, Tres LL: **Ran, a GTP-binding protein involved in nucleocytoplasmic transport and microtubule nucleation, relocates from the manchette to the centrosome region during rat spermiogenesis.** *Mol Reprod Dev* 2002, **63**(1):131-140.
74. Ramalho-Santos J, Moreno RD, Wessel GM, Chan EK, Schatten G: **Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis.** *Exp Cell Res* 2001, **267**(1):45-60.
75. Tang XM, Lalli MF, Clermont Y: **A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat.** *Am J Anat* 1982, **163**(4):283-294.
76. Huang WP, Ho HC: **Role of microtubule-dependent membrane trafficking in acrosomal biogenesis.** *Cell Tissue Res* 2006, **323**(3):495-503.

77. Styers ML, O'Connor AK, Grabski R, Cormet-Boyaka E, Sztul E: **Depletion of beta-COP reveals a role for COP-I in compartmentalization of secretory compartments and in biosynthetic transport of caveolin-1.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, **294**(6):C1485-1498.
78. Meistrich ML: **Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis.** *Eur Urol* 1993, **23**(1):136-141; discussion 142.
79. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL: **Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**(11):4628-4640.
80. Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM: **Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head.** *Dev Biol* 1971, **26**(2):220-251.
81. Rattner JB, Olson G: **Observations on the fine structure of the nuclear ring of the mammalian spermatid.** *J Ultrastruct Res* 1973, **43**(5):438-444.
82. Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML: **Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents.** *Am J Anat* 1991, **192**(2):97-120.
83. Mendoza-Lujambio I, Burfeind P, Dixkens C, Meinhardt A, Hoyer-Fender S, Engel W, Neesen J: **The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse.** *Hum Mol Genet* 2002, **11**(14):1647-1658.
84. Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Russell LD: **Abnormal manchette development in spermatids of azh/azh mutant mice.** *Am J Anat* 1990, **188**(1):74-86.
85. Zhou J, Du YR, Qin WH, Hu YG, Huang YN, Bao L, Han D, Mansouri A, Xu GL: **RIM-BP3 is a manchette-associated protein essential for spermiogenesis.** *Development* 2009, **136**(3):373-382.
86. Komada M, McLean DJ, Griswold MD, Russell LD, Soriano P: **E-MAP-115, encoding a microtubule-associated protein, is a retinoic acid-inducible gene required for spermatogenesis.** *Genes Dev* 2000, **14**(11):1332-1342.
87. Akhmanova A, Mausset-Bonnefont AL, van Cappellen W, Keijzer N, Hoogenraad CC, Stepanova T, Drabek K, van der Wees J, Mommaas M, Onderwater J *et al*: **The microtubule plus-end-tracking protein CLIP-170 associates with the spermatid manchette and is essential for spermatogenesis.** *Genes Dev* 2005, **19**(20):2501-2515.
88. Moreno RD, Palomino J, Schatten G: **Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis.** *Dev Biol* 2006, **293**(1):218-227.
89. Lalli M, Clermont Y: **Structural changes of the head components of the rat spermatid during late spermiogenesis.** *Am J Anat* 1981, **160**(4):419-434.
90. Oko RJ: **Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa.** *Reprod Fertil Dev* 1995, **7**(4):777-797.
91. Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C, Izumi T, Perry AC: **Mammalian phospholipase Czeta induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix.** *Dev Biol* 2004, **274**(2):370-383.
92. Alvarez Sedo C, Oko R, Sutovsky P, Chemes H, Rawe VY: **Biogenesis of the sperm head perinuclear theca during human spermiogenesis.** *Fertil Steril* 2009.
93. Lecuyer C, Dacheux JL, Hermand E, Mazeman E, Rousseaux J, Rousseaux-Prevost R: **Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin.** *Biol Reprod* 2000, **63**(6):1801-1810.
94. Rousseaux-Prevost R, Lecuyer C, Drobecq H, Sergheraert C, Dacheux JL, Rousseaux J: **Characterization of boar sperm cytoskeletal cyclin II as an actin-binding protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **303**(1):182-189.

95. Hurst S, Howes EA, Coadwell J, Jones R: **Expression of a testis-specific putative actin-capping protein associated with the developing acrosome during rat spermiogenesis.** *Mol Reprod Dev* 1998, **49**(1):81-91.
96. von Bulow M, Rackwitz HR, Zimbelmann R, Franke WW: **CP beta3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head.** *Exp Cell Res* 1997, **233**(1):216-224.
97. Heid H, Figge U, Winter S, Kuhn C, Zimbelmann R, Franke W: **Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head.** *Exp Cell Res* 2002, **279**(2):177-187.
98. Tubb B, Mulholland DJ, Vogl W, Lan ZJ, Niederberger C, Cooney A, Bryan J: **Testis fascin (FSCN3): a novel paralog of the actin-bundling protein fascin expressed specifically in the elongate spermatid head.** *Exp Cell Res* 2002, **275**(1):92-109.
99. Korley R, Pouresmaeili F, Oko R: **Analysis of the protein composition of the mouse sperm perinuclear theca and characterization of its major protein constituent.** *Biol Reprod* 1997, **57**(6):1426-1432.
100. Aul RB, Oko RJ: **The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B.** *Dev Biol* 2002, **242**(2):376-387.
101. Tovich PR, Sutovsky P, Oko RJ: **Novel aspect of perinuclear theca assembly revealed by immunolocalization of non-nuclear somatic histones during bovine spermiogenesis.** *Biol Reprod* 2004, **71**(4):1182-1194.
102. Kitamura K, Iguchi N, Kaneko Y, Tanaka H, Nishimune Y: **Characterization of a novel postacrosomal perinuclear theca-specific protein, CYPT1.** *Biol Reprod* 2004, **71**(6):1927-1935.
103. Hansen MA, Nielsen JE, Tanaka M, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H: **Identification and expression profiling of 10 novel spermatid expressed CYPT genes.** *Mol Reprod Dev* 2006, **73**(5):568-579.
104. Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML: **Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(9):4683-4688.
105. Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Gottges E, Topaloglu O, Dixkens C, Holstein AF, Engel W: **Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2).** *Mol Hum Reprod* 2001, **7**(6):513-520.
106. Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich ML: **Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice.** *Biol Reprod* 2004, **71**(4):1220-1229.
107. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM: **Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice.** *Biol Reprod* 2003, **69**(1):211-217.
108. Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I: **Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(8):2808-2813.
109. Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G, Cimini D, Degrossi F, Giordano R, Magnano AR, Lorenzini R, Lavia P, Spadafora C: **A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA.** *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 20):3537-3548.
110. Russell L: **Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis.** *Am J Anat* 1977, **148**(3):313-328.
111. Vogl AW, Soucy LJ: **Arrangement and possible function of actin filament bundles in ectoplasmic specializations of ground squirrel Sertoli cells.** *J Cell Biol* 1985, **100**(3):814-825.

112. Yan HH, Mruk DD, Wong EW, Lee WM, Cheng CY: **An autocrine axis in the testis that coordinates spermiation and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(26):8950-8955.
113. Mulholland DJ, Dedhar S, Vogl AW: **Rat seminiferous epithelium contains a unique junction (Ectoplasmic specialization) with signaling properties both of cell/cell and cell/matrix junctions.** *Biol Reprod* 2001, **64**(1):396-407.
114. Mueller S, Rosenquist TA, Takai Y, Bronson RA, Wimmer E: **Loss of nectin-2 at Sertoli-spermatid junctions leads to male infertility and correlates with severe spermatozoan head and midpiece malformation, impaired binding to the zona pellucida, and oocyte penetration.** *Biol Reprod* 2003, **69**(4):1330-1340.
115. Grove BD, Vogl AW: **Sertoli cell ectoplasmic specializations: a type of actin-associated adhesion junction?** *J Cell Sci* 1989, **93** (Pt 2):309-323.
116. Yazama F, Sawada H, Hirosawa K, Hayashi Y, Nishida T: **Deep-etch visualization of the Sertoli cell (blood-testis) barrier in the boar.** *Tissue Cell* 1991, **23**(2):235-246.
117. Bartles JR, Wierda A, Zheng L: **Identification and characterization of espin, an actin-binding protein localized to the F-actin-rich junctional plaques of Sertoli cell ectoplasmic specializations.** *J Cell Sci* 1996, **109** (Pt 6):1229-1239.
118. Fawcett DW: **The mammalian spermatozoon.** *Dev Biol* 1975, **44**(2):394-436.
119. Clermont Y, Oko R, Hermo L: **Immunocytochemical localization of proteins utilized in the formation of outer dense fibers and fibrous sheath in rat spermatids: an electron microscope study.** *Anat Rec* 1990, **227**(4):447-457.
120. Oko R: **Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa.** *Biol Reprod* 1988, **39**(1):169-182.
121. Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM: **A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum.** *Biol Reprod* 2003, **68**(6):2241-2248.
122. Phillips DM: **Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa.** *J Ultrastruct Res* 1977(2):144-154.
123. Cesario MM, Bartles JR: **Compartmentalization, processing and redistribution of the plasma membrane protein CE9 on rodent spermatozoa. Relationship of the annulus to domain boundaries in the plasma membrane of the tail.** *J Cell Sci* 1994, **107** (Pt 2):561-570.
124. Wargo MJ, Smith EF: **Asymmetry of the central apparatus defines the location of active microtubule sliding in Chlamydomonas flagella.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(1):137-142.
125. Turner RM: **Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?** *J Androl* 2003, **24**(6):790-803.
126. Morisawa M: **Cell signaling mechanisms for sperm motility.** *Zoolog Sci* 1994, **11**(5):647-662.
127. Nakamura N, Miranda-Vizuete A, Miki K, Mori C, Eddy EM: **Cleavage of disulfide bonds in mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase isozyme is associated with increased hexokinase activity and initiation of sperm motility.** *Biol Reprod* 2008, **79**(3):537-545.
128. Flesch FM, Gadella BM: **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1469**(3):197-235.
129. Brahmaraaju M, Shoeb M, Laloraya M, Kumar PG: **Spatio-temporal organization of Vam6P and SNAP on mouse spermatozoa and their involvement in sperm-zona pellucida interactions.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **318**(1):148-155.
130. Harrison RA: **Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate.** *Mol Reprod Dev* 2004, **67**(3):337-352.

131. Tash JS: **Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1989, **14**(3):332-339.
132. Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM: **pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation.** *Dev Biol* 1996, **173**(2):510-520.
133. Zeng Y, Clark EN, Florman HM: **Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion.** *Dev Biol* 1995, **171**(2):554-563.
134. Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE: **Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation.** *J Biol Chem* 2003, **278**(9):7001-7009.
135. Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM: **Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(12):6757-6762.
136. Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF: **CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(25):14864-14868.
137. Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL: **Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(25):14869-14874.
138. Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T: **Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg.** *J Biol Chem* 2002, **277**(33):30310-30314.
139. Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T: **Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(50):18028-18033.
140. Miller KA, Shao M, Martin-DeLeon PA: **Hyalp1 in murine sperm function: evidence for unique and overlapping functions with other reproductive hyaluronidases.** *J Androl* 2007, **28**(1):67-76.
141. Yanagimachi R: **Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity.** *Zygote* 1994, **2**(4):371-372.
142. Hartmann JF, Gwatkin RB, Hutchison CF: **Early contact interactions between mammalian gametes in vitro: evidence that the vitellus influences adherence between sperm and zona pellucida.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972, **69**(10):2767-2769.
143. Roldan ER, Murase T, Shi QX: **Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida.** *Science* 1994, **266**(5190):1578-1581.
144. Walensky LD, Snyder SH: **Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm.** *J Cell Biol* 1995, **130**(4):857-869.
145. Nixon B, Aitken RJ, McLaughlin EA: **New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction.** *Cell Mol Life Sci* 2007, **64**(14):1805-1823.
146. Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM: **Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(23):13004-13009.
147. Fukami K, Yoshida M, Inoue T, Kurokawa M, Fissore RA, Yoshida N, Mikoshiba K, Takenawa T: **Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm.** *J Cell Biol* 2003, **161**(1):79-88.

148. Ellis DJ, Shadan S, James PS, Henderson RM, Edwardson JM, Hutchings A, Jones R: **Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy.** *J Struct Biol* 2002, **138**(3):187-198.
149. Jones R, James PS, Oxley D, Coadwell J, Suzuki-Toyota F, Howes EA: **The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins.** *Biol Reprod* 2008, **79**(3):421-431.
150. Yanagimachi R, Noda YD: **Electron microscope studies of sperm incorporation into the golden hamster egg.** *Am J Anat* 1970, **128**(4):429-462.
151. Mendel G: **Experiments in plant hybridization.** *Proceedings of the Natural History Society of Brinn* 1866, **3**(47).
152. Carlborg O, Haley CS: **Epistasis: too often neglected in complex trait studies?** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(8):618-625.
153. Darvasi A: **Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models.** *Nat Genet* 1998, **18**(1):19-24.
154. Darvasi A, Soller M: **Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping.** *Genetics* 1995, **141**(3):1199-1207.
155. Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO, Taylor MS, Rawlins JN, Mott R, Flint J: **Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice.** *Nat Genet* 2006, **38**(8):879-887.
156. Bailey DW: **Recombinant-inbred strains. An aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes.** *Transplantation* 1971, **11**(3):325-327.
157. Demant P, Hart AA: **Recombinant congenic strains--a new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene.** *Immunogenetics* 1986, **24**(6):416-422.
158. Fortin A, Diez E, Henderson JE, Mogil JS, Gros P, Skamene E: **The AcB/BcA recombinant congenic strains of mice: strategies for phenotype dissection, mapping and cloning of quantitative trait genes.** *Novartis Found Symp* 2007, **281**:141-153; discussion 153-145, 208-149.
159. Ishikawa A, Kim EH, Bolor H, Mollah MB, Namikawa T: **A growth QTL (Pbwg1) region of mouse chromosome 2 contains closely linked loci affecting growth and body composition.** *Mamm Genome* 2007, **18**(4):229-239.
160. Guenet JL, Bonhomme F: **Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model.** *Trends Genet* 2003, **19**(1):24-31.
161. Newman TL, Tuzun E, Morrison VA, Hayden KE, Ventura M, McGrath SD, Rocchi M, Eichler EE: **A genome-wide survey of structural variation between human and chimpanzee.** *Genome Res* 2005, **15**(10):1344-1356.
162. Haldane JBS: **Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals.** *J Genet* 1922, **12**,:101-109.
163. Guenet JL, Nagamine C, Simon-Chazottes D, Montagutelli X, Bonhomme F: **Hst-3: an X-linked hybrid sterility gene.** *Genet Res* 1990, **56**(2-3):163-165.
164. Hemberger MC, Pearsall RS, Zechner U, Orth A, Otto S, Ruschendorf F, Fundele R, Elliott R: **Genetic dissection of X-linked interspecific hybrid placental dysplasia in congenic mouse strains.** *Genetics* 1999, **153**(1):383-390.
165. Burgio G, Szatanik M, Guenet JL, Arnau MR, Panthier JJ, Montagutelli X: **Interspecific recombinant congenic strains between C57BL/6 and mice of the *Mus spretus* species: a powerful tool to dissect genetic control of complex traits.** *Genetics* 2007, **177**(4):2321-2333.

166. Fortin A, Diez E, Rochefort D, Laroche L, Malo D, Rouleau GA, Gros P, Skamene E: **Recombinant congenic strains derived from A/J and C57BL/6J: a tool for genetic dissection of complex traits.** *Genomics* 2001, **74**(1):21-35.
167. Ewart-Toland A, Mounzih K, Qiu J, Chehab FF: **Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice.** *Endocrinology* 1999, **140**(2):732-738.
168. Storchova R, Gregorova S, Buckiova D, Kyselova V, Divina P, Forejt J: **Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse.** *Mamm Genome* 2004, **15**(7):515-524.
169. Elliott RW, Poslinski D, Tabaczynski D, Hohman C, Pazik J: **Loci affecting male fertility in hybrids between *Mus macedonicus* and C57BL/6.** *Mamm Genome* 2004, **15**(9):704-710.
170. Oka A, Mita A, Sakurai-Yamatani N, Yamamoto H, Takagi N, Takano-Shimizu T, Toshimori K, Moriwaki K, Shiroishi T: **Hybrid breakdown caused by substitution of the X chromosome between two mouse subspecies.** *Genetics* 2004, **166**(2):913-924.
171. Oka A, Aoto T, Totsuka Y, Takahashi R, Ueda M, Mita A, Sakurai-Yamatani N, Yamamoto H, Kuriki S, Takagi N *et al*: **Disruption of genetic interaction between two autosomal regions and the X chromosome causes reproductive isolation between mouse strains derived from different subspecies.** *Genetics* 2007, **175**(1):185-197.
172. Golas A, Dzieza A, Kuzniarz K, Styrna J: **Gene mapping of sperm quality parameters in recombinant inbred strains of mice.** *Int J Dev Biol* 2008, **52**(2-3):287-293.
173. Bartke A, Krzanowska H: **Spermatogenesis in mouse strains with high and low abnormal spermatozoa.** *J Hered* 1972, **63**(4):172-174.
174. Le Roy I, Tordjman S, Migliore-Samour D, Degrelle H, Roubertoux PL: **Genetic architecture of testis and seminal vesicle weights in mice.** *Genetics* 2001, **158**(1):333-340.
175. Bolor H, Wakasugi N, Zhao WD, Ishikawa A: **Detection of quantitative trait loci causing abnormal spermatogenesis and reduced testis weight in the small testis (Smt) mutant mouse.** *Exp Anim* 2006, **55**(2):97-108.
176. Bolor H, Zhao WD, Ishikawa A, Wakasugi N: **Arrest of spermatogenesis at the early meiotic stage in the small testis mutant (Smt) mice.** *Exp Anim* 2005, **54**(4):327-337.
177. Suto J: **Genetic dissection of testis weight in a mouse strain having an extremely large testis: major testis weight determinants are autosomal rather than Y-linked on the basis of comprehensive analyses in Y-chromosome consomic strains.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2008, **84**(9):393-406.
178. Zidek V, Pintir J, Musilova A, Bila V, Kren V, Pravenec M: **Mapping of quantitative trait loci for seminal vesicle mass and litter size to rat chromosome 8.** *J Reprod Fertil* 1999, **116**(2):329-333.
179. Jorritsma H, Jorritsma R: **[An overview of fertility statistics and milk production data of 15 dairy operations in southeast Friesland].** *Tijdschr Diergeneeskd* 2000, **125**(6):180-184.
180. Lucy MC: **Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?** *J Dairy Sci* 2001, **84**(6):1277-1293.
181. Xing Y, Ren J, Ren D, Guo Y, Wu Y, Yang G, Mao H, Brenig B, Huang L: **A whole genome scanning for quantitative trait loci on traits related to sperm quality and ejaculation in pigs.** *Anim Reprod Sci* 2008.

182. Sato S, Oyamada Y, Atsuji K, Nade T, Kobayashi E, Mitsuhashi T, Nirasawa K, Komatsuda A, Saito Y, Terai S *et al*: **Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan x Duroc F2 resource population.** *J Anim Sci* 2003, **81**(12):2938-2949.
183. Rohrer GA, Wise TH, Lunstra DD, Ford JJ: **Identification of genomic regions controlling plasma FSH concentrations in Meishan-White Composite boars.** *Physiol Genomics* 2001, **6**(3):145-151.
184. Fullard K, Margawati ET, Thomson PC, Raadsma HW: **QTL for testis size in ram lambs as an indicator of ovulation rate in an Indonesian Thin Tail by Merino resource flock.** *8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 2006, **4**(26).
185. Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R: **Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents.** *Nat Rev Genet* 2005, **6**(4):271-286.
186. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D *et al*: **Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family.** *Nat Genet* 2002, **31**(2):166-170.
187. Rong M, He W, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Perez CA, Mosinger B, Ninomiya Y, Margolskee RF, Damak S: **Signal transduction of umami taste: insights from knockout mice.** *Chem Senses* 2005, **30 Suppl 1**:i33-34.
188. Dam AH, Koscinski I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, Tournaye H, Charlet N, Lagier-Tourenne C, van Bokhoven H *et al*: **Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia.** *Am J Hum Genet* 2007, **81**(4):813-820.
189. Xu M, Xiao J, Chen J, Li J, Yin L, Zhu H, Zhou Z, Sha J: **Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12.** *Mol Hum Reprod* 2003, **9**(1):9-17.
190. Sekerkova G, Zheng L, Loomis PA, Changyaleket B, Whitlon DS, Mugnaini E, Bartles JR: **Espins are multifunctional actin cytoskeletal regulatory proteins in the microvilli of chemosensory and mechanosensory cells.** *J Neurosci* 2004, **24**(23):5445-5456.
191. Zheng L, Sekerkova G, Vranich K, Tilney LG, Mugnaini E, Bartles JR: **The deaf jerker mouse has a mutation in the gene encoding the espin actin-bundling proteins of hair cell stereocilia and lacks espins.** *Cell* 2000, **102**(3):377-385.
192. Jackson T, Thomas J, Green ED, Noben-Trauth K: **Genetic and physical maps of jerker (Espn(je)) on mouse chromosome 4.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **296**(5):1143-1147.
193. Sekerkova G, Zheng L, Loomis PA, Mugnaini E, Bartles JR: **Espins and the actin cytoskeleton of hair cell stereocilia and sensory cell microvilli.** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**(19-20):2329-2341.
194. Sekerkova G, Zheng L, Mugnaini E, Bartles JR: **Differential expression of espin isoforms during epithelial morphogenesis, stereociliogenesis and postnatal maturation in the developing inner ear.** *Dev Biol* 2006, **291**(1):83-95.
195. Lin YN, Roy A, Yan W, Burns KH, Matzuk MM: **Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**(19):6794-6805.
196. Holt LJ, Siddle K: **Grb10 and Grb14: enigmatic regulators of insulin action--and more?** *Biochem J* 2005, **388**(Pt 2):393-406.
197. Wang L, Balas B, Christ-Roberts CY, Kim RY, Ramos FJ, Kikani CK, Li C, Deng C, Reyna S, Musi N *et al*: **Peripheral disruption of the Grb10 gene enhances insulin signaling and sensitivity in vivo.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**(18):6497-6505.

198. Charalambous M, Smith FM, Bennett WR, Crew TE, Mackenzie F, Ward A: **Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(14):8292-8297.
199. Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF: **Testis determination requires insulin receptor family function in mice.** *Nature* 2003, **426**(6964):291-295.
200. Froment P, Vigier M, Negre D, Fontaine I, Beghelli J, Cosset FL, Holzenberger M, Durand P: **Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I.** *J Endocrinol* 2007, **194**(3):557-568.
201. Park SJ, Kim SJ, Rhee Y, Byun JH, Kim SH, Kim MH, Lee EJ, Lim SK: **Fidgetin-like 1 gene inhibited by basic fibroblast growth factor regulates the proliferation and differentiation of osteoblasts.** *J Bone Miner Res* 2007, **22**(6):889-896.
202. Blank RD, Campbell GR, D'Eustachio P: **Possible derivation of the laboratory mouse genome from multiple wild Mus species.** *Genetics* 1986, **114**(4):1257-1269.
203. Wade CM, Kulbokas EJ, 3rd, Kirby AW, Zody MC, Mullikin JC, Lander ES, Lindblad-Toh K, Daly MJ: **The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome.** *Nature* 2002, **420**(6915):574-578.
204. Yang H, Bell TA, Churchill GA, Pardo-Manuel de Villena F: **On the subspecific origin of the laboratory mouse.** *Nat Genet* 2007, **39**(9):1100-1107.
205. Edwards CJ, Baird JF, MacHugh DE: **Taurine and zebu admixture in Near Eastern cattle: a comparison of mitochondrial, autosomal and Y-chromosomal data.** *Anim Genet* 2007, **38**(5):520-524.
206. Halbert ND, Derr JN: **A comprehensive evaluation of cattle introgression into US federal bison herds.** *J Hered* 2007, **98**(1):1-12.
207. Verardi A, Lucchini V, Randi E: **Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (Canis lupus) by admixture linkage disequilibrium analysis.** *Mol Ecol* 2006, **15**(10):2845-2855.
208. Randi E: **Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives.** *Mol Ecol* 2008, **17**(1):285-293.
209. Voolstra C, Tautz D, Farbrother P, Eichinger L, Harr B: **Contrasting evolution of expression differences in the testis between species and subspecies of the house mouse.** *Genome Res* 2007, **17**(1):42-49.
210. Rottschmidt R, Harr B: **Extensive additivity of gene expression differentiates subspecies of the house mouse.** *Genetics* 2007, **177**(3):1553-1567.
211. Khaitovich P, Hellmann I, Enard W, Nowick K, Leinweber M, Franz H, Weiss G, Lachmann M, Paabo S: **Parallel patterns of evolution in the genomes and transcriptomes of humans and chimpanzees.** *Science* 2005, **309**(5742):1850-1854.
212. Turner LM, Chuong EB, Hoekstra HE: **Comparative analysis of testis protein evolution in rodents.** *Genetics* 2008, **179**(4):2075-2089.
213. Good JM, Nachman MW: **Rates of protein evolution are positively correlated with developmental timing of expression during mouse spermatogenesis.** *Mol Biol Evol* 2005, **22**(4):1044-1052.
214. Bergmann JA, Hohenboken WD: **Prediction of fertility from calfhood traits of Angus and Simmental heifers.** *J Anim Sci* 1992, **70**(9):2611-2621.
215. Jamrozik J, Fatehi J, Kistemaker GJ, Schaeffer LR: **Estimates of genetic parameters for Canadian Holstein female reproduction traits.** *J Dairy Sci* 2005, **88**(6):2199-2208.
216. Bormann JM, Totir LR, Kachman SD, Fernando RL, Wilson DE: **Pregnancy rate and first-service conception rate in Angus heifers.** *J Anim Sci* 2006, **84**(8):2022-2025.

V. Annexe

Touré A, Lhuillier P, Gossen JA, Kuil CW, Lhôte D, Jégou B, Escalier D, Gacon G.

The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. Hum Mol Genet. 2007

Brezillon NM, DaSilva L, L'Hôte D, Bernex F, Piquet J, Binart N, Morosan S, Kremsdorf D.

Rescue of fertility in homozygous mice for the urokinase plasminogen activator transgene by the transplantation of mouse hepatocytes. Cell Transplant. 2008

Benayoun BA, Batista F, Auer J, Dipietromaria A, L'Hôte D, De Baere E, Veitia RA.

Positive and negative feedback regulates the transcription factor FOXL2 in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. Hum Mol Genet. 2009

Laissue P, Burgio G, L'Hôte D, Renault G, Marchiol-Fournigault C, Fradelizi D, Fellous M, Serres C, Montagutelli X, Monget P, and Vaiman D.

An in vivo approach of the embryonic development in an interspecific recombinant congenic mice model reveals QTL responsible for embryonic lethality and resorption. Int J Dev Biol (accepté pour publication).

Laissue P, L'Hôte D, Serres C, Vaiman D.

Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. Animal. 2009

Résumé

La fertilité mâle est un caractère quantitatif, régulé par de nombreux gènes. Afin de positionner de nouveaux QTL de fertilité mâle, nous avons utilisé un ensemble de lignées interspécifiques, recombinantes et congéniques (IRCS). La primo-localisation de QTL dans le modèle IRCS nous a permis de positionner 8 QTL influençant des paramètres de la fertilité mâle, tels que le poids des testicules et de la prostate ainsi que la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes. Dans le but d'identifier des gènes candidats, nous avons ciblé notre étude sur deux lignées IRCS (44H et 97C). La lignée 44H présente une forte tératozoospermie. Une analyse de son transcriptome testiculaire nous a permis de proposer un gène candidat (*Espn*) que l'analyse cartographique n'a pas confirmé. Cette dernière approche est encore en cours pour cette lignée. La lignée 97C porte un QTL sur le chromosome 11, impliqué dans une réduction du poids testiculaire, associée à une tératozoospermie modérée. L'analyse en cartographie fine du QTL, nous a permis de proposer une région candidate de 10 gènes dont 4 sont significativement exprimés dans le testicule : *Grb10*, *Figl1*, *4930415F15Rik* et *Zbp1*. L'analyse de leur séquence permettra de proposer le meilleur candidat.

Par ailleurs, nous avons conduit une analyse du transcriptome testiculaire de trois lignées IRCS et des lignées parentales qui a montré comment des gènes *spretus* étaient régulés lorsqu'ils étaient introgressés dans un génome *musculus*. Cette étude nous a permis d'amorcer une réflexion sur la tolérance d'un génome vis-à-vis des flux de gènes entre espèces voisines dans la constitution d'un génome mosaïque.