



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



École doctorale BioSE « Biologie-Santé-Environnement »

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

préparée par

Mme. Imane AL-ASAAD

sur le sujet

Étude de marqueurs de différenciation testiculaire Sox9 et Amh lors d'un développement normal, d'une inversion sexuelle et d'un développement en absence de cellules germinales chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*.

Intérêt pour la physiologie comparée de la reproduction des vertébrés.

Soutenance prévue le 13 novembre 2013

Membres du jury :

Rapporteurs

M. Gabriel LIVERA, Professeur, Université Paris VII, Paris

M. Eric PAILHOUX, Directeur de Recherches, INRA, Jouy en Josas

Examineurs

Mme Nathalie di CLEMENTE, Directrice de Recherches, INSERM, Clamart

Mme May PENRAD-MOBAYED, Chargée de Recherches, CNRS, Paris

M. Michel FICK, Professeur, Université de Lorraine, ENSAIA, Nancy

M. Stéphane FLAMENT, Professeur, Université de Lorraine (Directeur de thèse), Nancy

À mon cœur ... Ahmad !

À mon petit prince ... Omar !

À mes parents... Saïd et Fatinah !

À mon frère Sami !

REMERCIEMENTS

Une thèse est une aventure longue marquée par différentes étapes plus ou moins joyeuses. C'est un chemin dont on connaît l'issue puisque nombreux sont ceux qui l'ont déjà parcouru avant nous ; mais c'est un chemin unique pour chacun, un chemin personnel à nul autre pareil.

Puisque me voilà arrivée au bout de ce chemin, la thèse pour moi a été une aventure très intéressante par laquelle j'ai découvert le monde merveilleux de la recherche qui est un univers complexe mais très passionnant. J'ai vécu une expérience très enrichissante ayant le plaisir d'apprendre sans cesse au niveau de la lecture scientifique autant qu'au niveau des manipes. Cette thèse n'est pas une fin en soi, mais c'est un moment particulier dans ma vie de jeune chercheur : il y aura eu un avant qui ne sera plus, et il y aura un après à construire. J'ai eu la chance de rencontrer des gens qui m'ont apporté énormément sur le plan scientifique autant que sur le plan humain et qui méritent aujourd'hui mes profonds remerciements puisque, sans eux, rien n'aurait été possible.

*Et c'est avec beaucoup d'émotion que je tiens à présenter ma plus sincère reconnaissance à mon directeur de thèse, le Pr. Stéphane FLAMENT, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire au moment délicat où toute l'équipe abandonnait la recherche sur le modèle amphibien *Pleurodeles waltl* pour se recentrer sur des modèles de cellules cancéreuses. Merci Stéphane de m'avoir encadrée durant ces quatre années, de m'avoir fait confiance pour réaliser mon projet de thèse, de m'accorder tant de temps sur un planning pourtant bien chargé, pour discuter et réfléchir ensemble et donner des idées constructives et de précieux conseils. Tes valeurs, tes capacités, ta personnalité et ton côté humain m'ont beaucoup marqués et mes mots ne suffiront jamais pour t'exprimer mon immense gratitude ! Et si je sors aujourd'hui enrichie de cette expérience, c'est principalement grâce à toi.*

Je tiens vivement à remercier les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour l'intérêt et le regard critique constructif qu'ils ont porté sur mon travail. Merci donc au Pr. Gabriel LIVERA et au Dr. Eric PAILHOUX, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci aux Dr. Nathalie di CLEMENTE et Dr. May PENRAD-MOBAYED pour avoir été présentes en tant qu'examinatrices. Je tiens à vous tous exprimer ma respectueuse considération et ma sincère gratitude. Votre examen de cette thèse et des travaux qui y sont présentés sera un privilège.

Je suis particulièrement sensible à l'honneur que me fait le Pr. Michel FICK puisque d'une part, il a accepté de présider mon jury de thèse, et d'autre part, c'est grâce à lui que j'ai pu continuer mes études supérieures en France. Je ne peux pas oublier, monsieur le professeur, notre discussion intéressante en Syrie ainsi que vos encouragements par rapport à mon niveau de français.

Mes remerciement s'adressent également au Ministère de l'Enseignement Supérieur de la République Arabe Syrienne et à l'Université de Damas pour m'avoir offert cette bourse. J'aimerais aussi remercier tous les membres du département de biologie animale à l'Université de Damas, principalement les Dr. Moustapha BASSAL et Dr. Georges DIB qui m'ont soutenue et encouragée durant cette thèse.

Toute ma gratitude va aussi particulièrement à Hélène DUMOND, qui m'a fait profiter de son immense connaissance scientifique ainsi que de très bons moments. Je voudrais te remercier de tout ce que tu as fait pour moi et te dire toute mon admiration pour tes valeurs tant personnelles que professionnelles.

Pendant mon travail de thèse, j'ai pu bénéficier des conseils et du soutien à la fois scientifique et amical de nombreuses personnes. Merci Sabine MAZERBOURG, Isabelle GRILLIER-VUISSOZ, Sandra KUNTZ et Amand CHESNEL pour vos encouragements, vos conseils, et les échanges scientifiques qui m'ont largement inspirée et m'inspireront encore. C'est toujours agréable et un vrai plaisir de travailler avec vous !

Je n'oublie pas de remercier le Dr. Dominique CHARDARD qui m'a aidé, par son expérience, sa disponibilité et surtout sa patience, dans mes premiers pas de la vie d'une jeune chercheur en master.

Je voudrais sincèrement remercier Martine CHILLET qui m'a enseigné les techniques de l'immuno-histologie et l'hybridation in situ et m'a donné de précieux conseils. Merci Martine pour ta sympathie et nos longues conversations. Merci aussi à Alexandra KLEINKLAUSS pour ses bons conseils techniques et sa gentillesse.

Je remercie également Sylvie LAINE pour sa sympathie, sa gentillesse, son sourire et nos discussions non seulement sur le travail, mais aussi sur le plan humain.

Un merci tout spécial à Lucie MOITRIER pour son dynamisme, sa gentillesse, son enthousiasme et surtout son amitié. Merci Lucie pour ta bonne humeur, même dans les moments difficiles. Merci pour les «pauses cappuccino». C'est deux ans passés ensemble m'ont permis de gagner une véritable amie pour toute ma vie. Je te souhaite tout le succès que tu mérites dans ta carrière et ta vie.

Cette thèse n'aurait pas été une si belle aventure sans la présence et le soutien de tous ceux qui ont accompagné mes journées. Merci donc à Sarra et Angelina pour nos longues discussions au bureau ainsi que pour le lien que nous avons gardé après votre départ. Merci également à Christelle, Marie, Hussein, Rémi et Ali pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Félicitations à Audrey et Clémence pour leur brillante réussite en master !! je vous souhaite bonne chance pour la suite de vos thèses, les filles !!

Je remercies également mes amies et mes proches qui m'ont soutenue tout au long de ces quatre années de thèse malgré la distance, particulièrement : Hanaa, Aména, Nabil et Mahmoud. Un merci spécial à ma grand-mère qui m'a beaucoup encouragée.

Des personnes plus intimes méritent des remerciements plus profonds, à eux je dédie ce travail.

Je remercie ceux qui ont fait de moi ce que je suis maintenant, ceux grâce à qui tant d'années d'études ont été possibles, ceux envers qui j'ai une dette imprescriptible, mon père Saïd et ma mère Fatinah. Papa, tu es une vraie école, je ne cesse d'apprendre tous les jours avec toi. Merci pour tes encouragements et tes mots sincères qui resteront toujours dans mon esprit pour toute ma vie. Maman, tu es une femme aussi adorable, tu as toujours été là pour moi et à aucun moment tu n'as cessé de me couvrir de ta tendresse. C'est à vous deux que je dois cette réussite, et je suis fière de vous l'offrir. Votre absence à ma soutenance me manquera beaucoup.

Je remercie également Sami, mon frère unique, qui m'a toujours soutenue et encouragée. Merci pour ta bonne humeur et bravo pour ton excellente réussite au bac malgré les conditions difficiles. Je te souhaite de tout mon cœur de réaliser ton rêve en faisant des études supérieures en mathématiques que tu adores « Sami le génie des maths !! ». Mon amour pour toi restera sans limite.

Mes remerciements vont également à ma belle famille pour leur infaillible soutien et leur amour durant tout ce temps.

Enfin, je garde mes remerciements amoureux pour ma petite famille :

Un grand merci à Ahmad mon mari bien aimé. Merci pour le soutien infini, pour la patience exemplaire que tu as démontré durant ces années. Sans toi, Ahmad, tout aurait été plus difficile. Tu as toujours été à mes côtés pour m'écouter, me conseiller et supporter ma mauvaise humeur surtout pendant la rédaction de cette thèse. Merci pour ta lecture de mon manuscrit et toutes les remarques précieuses. Ton sourire et ton regard resteront mes sources de confort et de bonheur. Je te remercie aussi pour tout l'amour que tu m'as apporté et qui a beaucoup contribué à ma réussite. Tu resteras toujours l'étoile qui brille au creux de moi. Merci pour tous les rêves passés et ceux qui viendront avec toi !! Je t'aime !!

Depuis mai 2012, j'ai eu mon petit éclat de vie, la source de mes joies, le secret de ma force et de mon inspiration ; mon petit prince Omar !! Voilà enfin la raison de poursuivre mon histoire !! Je suis très fière de toi mon petit chéri et je le serai toujours.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

11β-OHA	11 β Hydroxyandrostenedione
3/17 βHSD	3/17 β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase
aa	Acide Aminé
AcR	Acide Rétinoïque
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALK	Activin-Like Kinase
ALK6-KD	ALK6 Kinase-Deficient
AMH	Anti-Müllerian Hormone
AMHR-I	AMH Receptor type I
AMHR-II	AMH Receptor type II
AMP	Adénosine Monophosphate
AP2	Activating Protein 2
AR	Androgen Receptor
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASW	Avian, Sex-specific, W-linked
ATP	Adénosine Triphosphate
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR-I	BMP Receptor type I
Bu	Busulfan
CaM	Calmoduline
cAMP	cyclic AMP
CBP	CREB-Binding Protein
CD	Dysplasie Campomélique
CG	Cellules Germinales
CGP	Cellules Germinales Primordiales
ChIP	Chromatin Immuno-Precipitation
CHO-3W	Chinese Hamster Ovary
CO	Cordons Ovigères
Col2α1	Collagène Type II Alpha 1
COS	Cercopithecus aethiops, Origin-defective SV-40
Co-Smads	Common Mediator Smads
CREB	cAMP Response Element-Binding protein
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
CSE	Cellules Souches Embryonnaires
CVH	Chicken Vasa Homologue
Cyp19	Cytochrome P450 isoforme 19
Cyp26	Cytochrome P450 isoforme 26
DAZL	Deleted in Azoospermia-Like
DHT	Dihydrotestostérone
DIG	Digoxigénine
DMC1	Disrupted Meiotic cDNA 1
DMRT1	Doublesex and Mab-3- related transcription factor 1
dm-W	DM-domain gene on the W chromosome

dmY	DM-domain gene on the Y chromosome
dnd	dead end gene
E₂	Oestradiol
eIF-4A	eukaryotic Initiation Factor 4A
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERE	Estrogen-Response Element
ESD	Environemental Sex Determination
FET-1	Female-Expressed Transcript 1
FGF9	Fibroblast Growth Factor 9
FGFR2	FGF Receptor 2
FMO	Follicules Multi-Ovocytes
FOG1	Friends of GATA
FOXL2	Forkhead box L2
FPT	Female Producing Temperature
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
Fst	Follistatine
GDFs	Growth Differentiation Factors
GLH-1	Germ Line Helicase-1
GM	Complexes Gonades-Mésonephros
GSD	Genetic Sex Determination
gsdf^Y	gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome
HATS	Histone Acétyltransférase
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
HDAC	Histone Désacétylases
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
HMG	High Mobility Group
HSP70	Heat Shock Protein 70
I-Smads	Inhibitory Smads
jpc	jours post-coïtum
jpf	jours post-fécondation
jph	jours post-hatching
jpp	jours post-partum
jpt	jours post-traitement
KO	Knockout
LH	Hormone Lutéinisante
L-Ptgds/Ptgds	Lipocalin Prostaglandine D Synthase
MIF	Müllerian Inhibiting Factor
MIS	Müllerian Inhibiting Substance
MixPT	Mixed-sex Producing Tepmerature
MOs	Morpholinos
MPT	Male Producing Temperature
MPTs	Modifications Post-Traductionnelles
MVH	Murine Vasa Homologue
NES	Nuclear Export Signal
NFκB	Nuclear-factor κB
NLS	Nuclear Localisation Signal
NPC	Nuclear Pore Complexes
NTPases	Nucléoside Triphosphatases

Ods	Ocular Degeneration with Sex Reversal
ORF	Open Reading Frame
P450scc	Side chain clivage
pb	Paires de bases
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PGD2	Prostaglandine D2
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT 1
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PMDS	Persistence of Müllerian Ducts Syndrome
PTHrP	Parathyroid-Hormone-Related Protein
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RALDH2	Rétinaldéhyde Déshydrogénase 2
RanGAP	Ran GTPase Activating Protein
RanGEF	Ran Guanine Exchange Factor
RI	Rayonnements Ionisants
R-Smads	Receptor-Regulated Smads
Rspo1	R-spondin 1
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
sdY	sexually dimorphic on the Y chromosome
SF1	Steroidogenic Factor 1
Smads	Sma- and Mad-related protein
SOX9	SRY-related HMG box
Sp1	Specificity Protein 1
Sry	Sex determining Region of Y chromosome
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
Stra8	Stimulated By Retinoic Acid Gene 8
SUMOylation	Small Ubiquitin-like Modification
SV40	Simian Virus 40
T	Testostérone
TCM	Testis-Conditioned Medium
TDF	Testis Determining Factor
TES	Testis-specific Enhancer of Sox9
TESCO	TES core
Tfm	Testicular Feminized Mouse
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TIP60	Tat interactive protein-60
TSD	Temperature Sex Determination
TSP	Thermo-Sensitive Period
Wnt4	Wingless-related murine-mammary-tumour-virus integration site 4
Wt1	Wilms tumor protein
Xvlg-1	Xenopus vasa-like gene-1

NOMENCLATURE

Pour une question d'harmonisation, la nomenclature suivante a été adoptée :

Espèce	Gène	Protéine
Homme	<i>GENE</i>	PROTEINE
Autre mammifère	<i>Gène</i>	PROTEINE
Oiseaux	<i>GENE</i>	PROTEINE
Reptiles	<i>gène</i>	PROTEINE
Amphibiens	<i>gène</i>	Protéine
Poissons	<i>gène</i>	Protéine

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION GENERALE	2
Déterminisme et différenciation du sexe	3
Les facteurs déterminants du sexe	3
Déterminisme génétique du sexe ou GSD	3
Déterminisme environnemental du sexe ou ESD	6
Généralités sur la différenciation gonadique chez les vertébrés	8
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	10
I) Le Modèle d'étude : <i>Pleurodeles waltl</i>	11
I.1) Biologie et Développement	11
I.1.1. Principales caractéristiques biologiques et mode de reproduction	11
I.1.2. Développement morphologique; mode de vie et métamorphose	12
I.2. Déterminisme du sexe	12
I.3. Différenciation gonadique	14
I.3.1. Origine des cellules germinales chez le pleurodèle	14
I.3.2. Formation de la crête génitale et établissement des gonades indifférenciées	15
I.3.3. La prolifération des cellules germinales primordiales	15
I.3.4. Caractéristiques histologiques des gonades différenciées	16
I.3.5. Entrée en méiose et gamétogenèse	17
I.3.5.1. Entrée en méiose	17
I.3.5.2. Gamétogenèse	18
I.3.5.2.1. Ovogenèse	18
I.3.5.2.2. Spermatogenèse	19
I.4. Modifications de la différenciation sexuelle	20
I.4.1. Influence de la température	20
I.4.2. Influence des hormones stéroïdes sexuelles	21
I.4.2.1. Stéroïdes et différenciation sexuelle	22
I.4.2.2. Aromatase et différenciation sexuelle	23
I.4.2.2.1. Aromatase et différenciation femelle	24
I.4.2.2.2. Aromatase et effet de la température	24
I.4.2.3. SF1 (<i>Steroidogenic Factor 1</i>)	24
I.4.3. Parabiose	26
I.5. Différenciation du tractus génital	27
II) Les facteurs SOX	28
II.1) Généralités: Structure moléculaire et Fonction	28
II.2. Le gène Sox9 (<i>Sry-related HMG box 9</i>)	30
II.2.1. Généralités	30
II.2.2. Structure moléculaire	31
II.2.3. Localisation subcellulaire	32

II.2.4. Le système d'import nucléaire de la protéine SOX9	33
II.2.4.1. N-terminale NLS : la voie de calmoduline/Ca ²⁺	33
II.2.4.2. C-terminale NLS : la voie importine-β	33
II.2.5. L'export nucléaire de la protéine SOX9	34
II.2.6. Les modifications post-traductionnelles de SOX9	34
II.2.7. La régulation transcriptionnelle du gène <i>Sox9</i> dans les gonades	36
II.2.8. Rôle de SOX9	38
II.2.8.1. Chez les mammifères	38
II.2.8.2. Chez les autres vertébrés	39
III) L'Hormone anti-Müllerienne (AMH)	42
III.1) Généralités : Définition et Découverte	42
III.2) Le ligand AMH et ses effets biologiques	43
III.2.1) Structure moléculaire du gène et de la protéine	43
III.2.1.1) Le gène de l' <i>Amh</i>	43
III.2.1.2) La protéine AMH	44
III.2.2) Régulation de l'expression de l' <i>Amh</i>	45
III.2.2.1) Régulation moléculaire de l' <i>Amh</i>	45
III.2.2.2) Régulation hormonale de l'AMH	47
III.2.2.2.1) Régulation par les androgènes	47
III.2.2.2.2) Régulation par les gonadotrophines	48
III.2.2.3) Régulation de l'AMH par les cellules germinales	49
III.2.3) Expression de l'AMH	50
III.2.3.1) L'AMH dans le testicule	50
III.2.3.1.1) Dans le testicule fœtal	50
III.2.3.1.2) Dans le testicule postnatal	51
III.2.3.2) L'AMH dans l'ovaire	51
III.2.4) Les modèles transgéniques et les Knock-out de l' <i>Amh</i>	51
III.3) Les récepteurs de l'AMH	52
III.3.1) La voie de transduction de la famille du TGF-β	52
III.3.2) Récepteur de l'AMH de type II (AMHR-II)	53
III.3.2.1) Clonage du gène <i>Amhr-II</i>	53
III.3.2.2) Structure moléculaire du gène et de la protéine	54
III.3.2.3) Site de l'expression	54
III.3.2.4) Régulation de l'AMHR-II	55
III.3.2.5) Les modèles Knock-out de l'AMHR-II	56
III.3.2.6) Le syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS)	57
III.3.2.6.1) Biologie et bases moléculaires du PMDS	57
III.3.2.6.2) Mutations du gène <i>AMH</i>	57
III.3.2.6.3) Mutations du gène <i>AMHR-II</i>	58
III.3.3) Récepteurs de l'AMH de type I	59
III.3.3.1) Structure moléculaire	60
III.3.3.2) Les caractéristiques d'AMHR-I	60
III.3.3.2.1) L'Interaction avec AMHR-II	60
III.3.3.2.2) Expression dans les organes cibles	61
III.3.3.2.3) L'Activation des gènes cibles	61
III.3.3.2.4) La médiation des effets physiologiques de l'AMH	62
III.3.4) La voie de signalisation des Smad	63
III.3.4.1) Généralités	63
III.3.4.2) La voie de signalisation AMH/Smad1	63

III.4) Rôle de l'AMH chez les vertébrés	65
III.4.1) Chez les mammifères	65
III.4.1.1) Dans le développement gonadique	65
III.4.1.2) Dans la stéroïdogénèse.....	66
III.4.1.3) Dans la folliculogénèse.....	67
III.4.1.4) Etudes cliniques	69
III.4.2) Chez les sauropsidés	69
III.4.3) Chez les poissons	70
IV) Développement gonadique en absence des cellules germinales.....	73
IV.1) Généralités sur la lignée germinale	73
IV.2) VASA	73
IV.2.1) Généralités sur la famille à boîte DEAD : motifs conservés et fonctions associées.....	74
IV.2.2) Origine du gène <i>vasa</i>	76
IV.2.3) Structure moléculaire de la protéine et du gène	76
IV.2.4) Régulation de l'expression de <i>vasa</i> et localisation subcellulaire	77
IV.2.5) VASA et la détermination de la lignée germinale.....	79
IV.2.5.1) Chez la drosophile et le nématode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	79
IV.2.5.2) Chez les amphibiens	80
IV.2.5.3) Chez les poissons.....	81
IV.2.5.4) Chez les oiseaux et les reptiles	82
IV.2.5.5) Chez les mammifères.....	84
IV.2.6) VASA et la migration des CGP	85
IV.3) Développement gonadique en absence de cellules germinales	85
IV.3.1) Méthodes utilisées afin d'éliminer les cellules germinales.....	86
IV.3.1.1) Irradiation	86
IV.3.1.1.1) Généralités.....	86
IV.3.1.1.2) Les effets biologiques des rayonnements ionisants sur les cellules.....	87
IV.3.1.2) Invalidation de gènes de cellules germinales.....	87
IV.3.1.3) Traitement par les agents alkylants.....	88
IV.3.1.3.1) Le Busulfan : structure, mode d'action et rôle	89
IV.3.2) Effet de l'absence des cellules germinales sur la différenciation gonadique chez les vertébrés	90
IV.3.2.1) Chez les mammifères.....	90
IV.3.2.2) Chez les sauropsidés.....	93
IV.3.2.3) Chez les poissons.....	95
IV.3.2.4) Chez les amphibiens	97
OBJECTIFS DE LA THESE	99
RESULTATS.....	102
I. Etude de deux marqueurs potentiels de la différenciation testiculaire (Sox9-Amh) chez l'amphibien urodèle <i>Pleurodeles waltl</i>	103
I.1) Etude de l'expression de Sox9 au cours de la différenciation sexuelle chez l'amphibien <i>Pleurodeles waltl</i>.....	103
I.1.1) Introduction	103
I.1.2) Principaux résultats.....	105
I.1.3) Conclusion	106
Article 1.....	108

I.2) Etude de l'expression de l'Amh au cours de la différenciation sexuelle chez l'amphibien <i>Pleurodeles waltl</i>.....	109
I.2.1) Introduction	109
I.2.2) Principaux résultats.....	110
I.2.3) Conclusion	112
Article 2.....	113
I.3) Données supplémentaires concernant les études de Sox9 et Amh.....	114
II. Etude de développement gonadique sans cellules germinales chez l'amphibien urodèle <i>Pleurodeles waltl</i>.....	115
II.1) Etude de l'effet de l'absence de cellules germinales au cours du développement gonadique chez l'amphibien <i>Pleurodeles waltl</i>.....	115
II.1.1) Introduction	115
II.1.2) Principaux résultats	116
II.1.3) Conclusion.....	118
Article 3.....	119
II.2) Résultats supplémentaires concernant l'effet de l'absence de CG chez les Pleurodèles adultes.....	120
II.2.1) D'un point de vue morphologique et histologique	120
II.2.2) Etude moléculaire.....	120
II.2.3) Effet de l'absence de CG sur la prolifération cellulaire dans les gonades.....	121
DISCUSSION GENERALE CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
I. Sox9 est-il un bon marqueur de la différenciation testiculaire chez le pleurodèle ?	123
II. Sox9 joue-t-il un rôle au cours de l'ovogenèse chez le pleurodèle ?.....	125
III. L'Amh est-elle un bon marqueur de la différenciation testiculaire chez le pleurodèle ?	126
III.1. L' <i>amh</i> présente une expression dimorphique avant le début de la différenciation histologique des gonades chez le pleurodèle	127
III.2. Une expression élevée de l' <i>amh</i> est toujours en accord avec un développement testiculaire lors d'inversions sexuelles chez le pleurodèle.....	128
IV. Pourquoi les canaux de Müller ne régressent-ils pas chez les pleurodèles mâles ?.....	131
V. Quel rôle l'Amh joue-t-elle chez le pleurodèle ?	132
VI. Les cellules germinales ont-elles un rôle dans la différenciation gonadique chez le pleurodèle ?	135
VII. Conclusion	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	140

AVANT-PROPOS

Cette thèse s'inscrit dans le contexte de la physiologie comparée de la reproduction, visant à mieux comprendre le processus de la différenciation gonadique chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*. Notre laboratoire utilise ce modèle depuis de nombreuses années pour étudier la différenciation gonadique et notamment le rôle des stéroïdes sexuels et des perturbateurs endocriniens dans ce processus. En ce qui concerne la différenciation testiculaire chez cet amphibien, aucune étude sur des gènes marqueurs de la différenciation testiculaire précoce n'avait été publiée. Aussi, ma thèse a porté sur deux gènes habituellement associés au processus de différenciation testiculaire chez la plupart des vertébrés (*sox9* et *amh*).

Ce manuscrit comprend quatre parties :

- 1. L'introduction générale.** Cette partie est consacrée au déterminisme sexuel et à la différenciation gonadique chez différents vertébrés.
- 2. Etude bibliographique.** Cette partie a été divisée en quatre chapitres. Le premier est consacré à notre modèle d'étude, le pleurodèle, en résumant les études réalisées et les résultats obtenus chez cette espèce. Le deuxième chapitre s'intéresse à Sox9, un acteur important du développement testiculaire chez les vertébrés. Le troisième chapitre est focalisé sur l'hormone anti-Müllerienne (Amh), hormone peptidique produite par le testicule différencié, responsable de la régression des canaux de Müller chez les mâles des amniotes. Enfin, le quatrième chapitre aborde l'importance des cellules germinales au cours de la différenciation gonadique chez différents vertébrés.
- 3. Résultats.** Cette partie comporte un premier aspect lié aux gènes *sox9* et *amh* du pleurodèle. Elle regroupe deux articles parus respectivement dans Journal of Experimental Zoology et Endocrinology. Le deuxième aspect relate une étude sur l'effet de l'absence de cellules germinales, obtenue à la suite d'un traitement au busulfan, sur le développement gonadique chez le pleurodèle. Cette étude est présentée sous forme d'un article paru dans Sexual Development.
- 4. Discussion générale, conclusion et perspectives.** Cette partie vise à comparer nos résultats sur le pleurodèle avec ceux obtenus chez d'autres vertébrés, et à proposer quelques perspectives.

Ce mémoire de thèse apporte des données nouvelles, utiles à la caractérisation de la différenciation sexuelle du pleurodèle. Notre travail permet de mieux connaître le développement gonadique chez les amphibiens et de le comparer à celui d'autres vertébrés. Le point le plus intéressant est celui qui a trait à la découverte de l'hormone anti-Müllerienne chez un amphibien, avec un rôle probablement différent de celui exercé chez les amniotes.

INTRODUCTION GENERALE

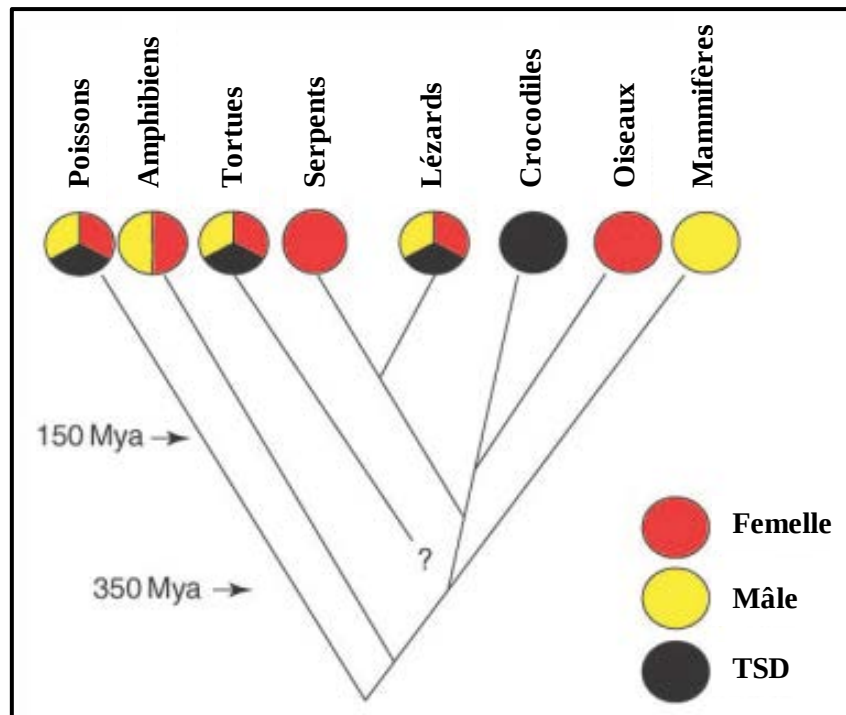


Figure 1 : Les principaux déterminismes du sexe chez les vertébrés. La plupart des vertébrés présentent un déterminisme du sexe génétique, soit de type hétérogamétique femelle (ZW, en rouge), soit de type hétérogamétique mâle (XY, en jaune). D'autres vertébrés présentent un déterminisme du sexe dépendant de la température (TSD, en noir), en particulier chez les vertébrés non-mammaliens. Au sein d'un même phylum, voire même au sein d'une même espèce, différents types de déterminisme peuvent se côtoyer. Une question dans la phylogénomique contemporaine des reptiles concernant le rattachement des tortues à d'autres reptiles reste à élucider (d'après Modi & Crews, 2005).

Depuis l'antiquité, l'homme s'est interrogé sur les mécanismes qui permettent à un embryon initialement dimorphique de devenir mâle ou femelle. En effet, le déterminisme et la différenciation du sexe sont des événements majeurs et complexes lors du développement d'un organisme. C'est du bon déroulement de ces étapes que dépendra la réalisation de la fonction de reproduction à l'état adulte.

Déterminisme et différenciation du sexe

Le déterminisme du sexe est considéré comme étant l'ensemble des facteurs initiateurs (génétiques, environnementaux) qui vont diriger la gonade bipotente vers l'un des deux sexes, alors que la différenciation sexuelle correspond au processus physiologique amenant le développement même des gonades vers un testicule ou un ovaire. Cette phase est obligatoire pour que les gonades deviennent ensuite matures et que l'organisme puisse se reproduire.

Les facteurs déterminants du sexe

Chez les vertébrés, le déterminisme du sexe est généralement divisé en deux catégories : déterminisme génétique (GSD ; *Genetic Sex Determination*) et déterminisme environnemental (ESD ; *Environmental Sex Determination*) (Uller & Helanterä, 2011). Chez les organismes GSD, le sexe gonadique est déterminé au moment de la fécondation par des gènes précis et indispensables, tandis que chez les organismes ESD, des conditions environnementales particulières (température, pH, facteurs sociaux, *etc*) influencent le devenir sexuel de l'embryon à un stade précis du développement (Nakamura, 2010) (Figure 1).

Déterminisme génétique du sexe ou GSD

Le déterminisme génétique du sexe repose principalement sur deux systèmes : une hétérogamétie mâle avec des chromosomes sexuels de type X ou Y comme le cas des mammifères où le sexe mâle étant XY (Waters *et al.*, 2007; Welshons & Russell, 1959), ou bien une hétérogamétie femelle avec des chromosomes sexuels Z ou W comme chez les oiseaux dont le sexe femelle est de type ZW (Chue & Smith, 2011). Le sexe peut être directement identifié par l'analyse d'un caryotype parce que ces chromosomes sexuels sont morphologiquement différents. Par ailleurs, la majorité des vertébrés possèdent des gènes qui s'expriment exclusivement dans un sexe ou différenciellement selon le sexe, et la différenciation du sexe est déterminée donc par l'expression génétique.

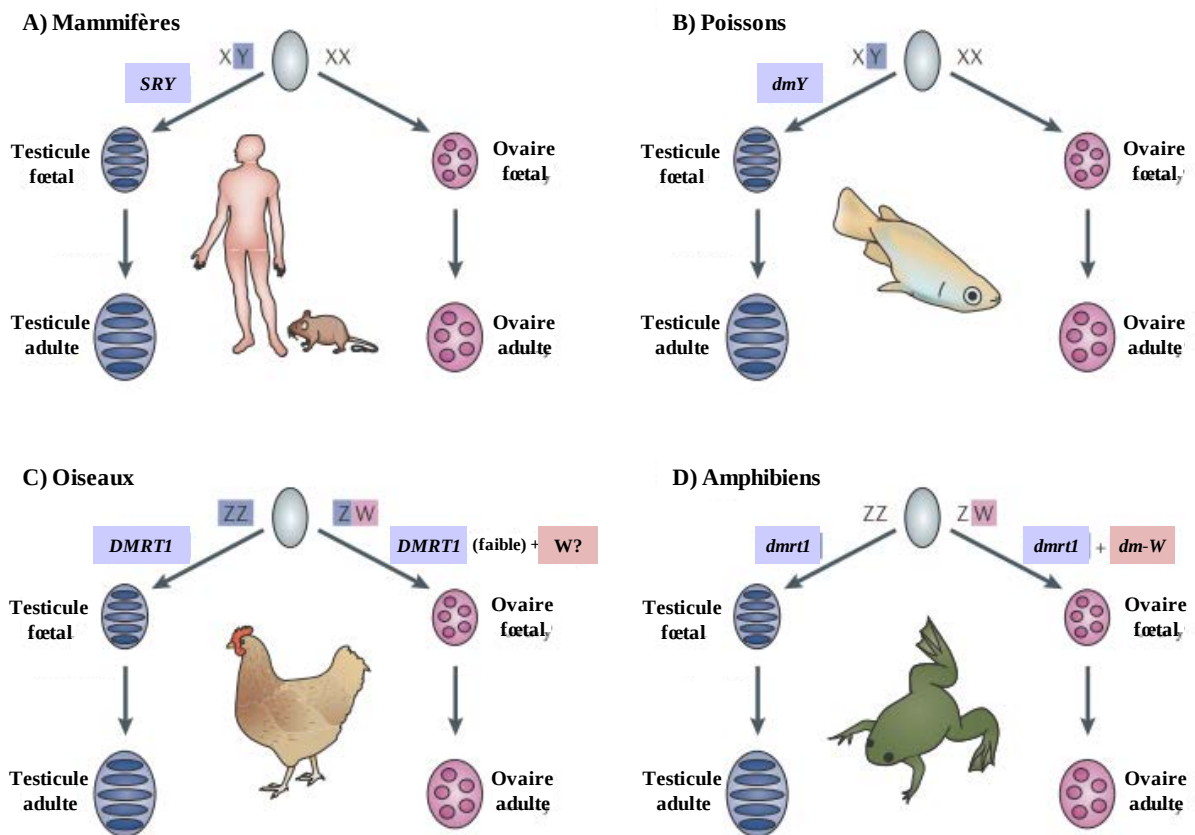


Figure 2 : Le déterminisme génétique du sexe. Le bleu indique les fonctions masculinisantes et le rose indique les fonctions féminisantes. **A)** Chez les mammifères (XX/XY), l'expression de *SRY* dans la gonade fœtale déclenche le développement mâle en activant la transcription de *SOX9* au cours d'une période cruciale alors qu'en absence de *SRY*, le développement ovarien se produit. **B)** Chez le poisson medaka (XX/XY), le gène *dmY* (ou *dmrt1Yb*) correspondant à une version dupliquée du gène autosomal *dmrt1*, joue un rôle analogue à celui de *SRY* en déclenchant le développement testiculaire. **C)** Chez les oiseaux (ZZ/ZW), *DMRT1* est un gène lié au chromosome Z et donc les mâles génétiques ont deux copies, tandis que les femelles en ont un seul exemplaire. **D)** Chez l'amphibien *Xenopus laevis* (ZZ/ZW), un gène dupliqué et tronqué de *dmrt1* ; *dm-W* se trouve sur le chromosome W et semble bloquer la capacité du gène autosomal *dmrt1* qui dirige la différenciation du sexe mâle (d'après Matson & Zarkower, 2012).

Chez les mammifères, la différenciation sexuelle est sous le contrôle d'un déterminant majeur du sexe porté par le chromosome sexuel Y. L'expression de ce déterminant conduit à la différenciation de l'individu en mâle (Figure 2). Ce déterminant majeur du sexe est le gène dominant *Sry* (*Sex determining Region of Y chromosome*) connu et bien documenté à l'heure actuelle (Koopman *et al.*, 1991; Sinclair *et al.*, 1990; Zhao & Koopman, 2012). En effet, *Sry*, nommé TDF (*Testis Determining Factor*), est le gène clé responsable du développement des testicules chez les embryons XY. Il joue un rôle indispensable afin d'activer plusieurs gènes chargés de diriger la différenciation des cellules de Sertoli et la formation de l'architecture du testicule (Parma & Radi, 2012; Sekido & Lovell-Badge, 2013).

Chez les oiseaux, il semble que, le gène *DMRT1* (*Doublesex and Mab-3- related transcription factor 1*), localisé sur le chromosome Z et connu chez les vertébrés pour son implication dans la différenciation testiculaire, joue un rôle clé dans le déterminisme sexuel par un nombre différents de copies, une seule copie de ce gène chez la femelle mais deux copies chez le mâle (Matson & Zarkower, 2012; Smith *et al.*, 2009) (Figure 2). Par ailleurs, la découverte d'un gène *ASW* (*Avian, Sex-specific, W-linked*), lié au chromosome W ainsi que son expression femelle spécifique suggère un rôle important de ce chromosome dans la différenciation sexuelle (O'Neill *et al.*, 2000; Smith & Sinclair, 2004). Un autre gène a été identifié chez les oiseaux, *FET-1* (*Female-Expressed Transcript 1*). Il n'est pas lié à *ASW*, mais il est aussi situé sur le chromosome W. Son expression a été observée uniquement dans les gonades femelles (Reed & Sinclair, 2002; Smith & Sinclair, 2004).

Chez les poissons, un déterminant majeur du sexe a été identifié chez l'espèce medaka, *Oryzias latipes*, qui présente un système d'hétérogamétie mâle XX/XY (Figure 2). C'est le gène *dmY* (*DM-domain gene on the Y chromosome*), ou *dmrt1Yb*, qui est un homologue de *dmrt1*, gène très conservé dans la fonction mâle, situé sur le chromosome Y du medaka (Matsuda *et al.*, 1998). Il joue un rôle nécessaire et suffisant pour déclencher le développement testiculaire, tout comme *Sry* chez les mammifères (Matsuda *et al.*, 2002, 2007; Kobayashi *et al.*, 2013). Ce gène correspond à une version dupliquée du gène autosomal *dmrt1* : ils présentent une similarité de 93% au niveau nucléotidique et 90% au niveau protéique (Nanda *et al.*, 2002; Nakamura, 2010). La duplication générant *dmY* semble avoir eu lieu récemment au cours de l'évolution (Kondo *et al.*, 2003; Volff *et al.*, 2003), ce qui explique pourquoi ce déterminant principal du sexe *dmrt1bY* n'a été retrouvé que dans une seule espèce proche, *O. curvinotus* (Matsuda *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2013) et pas chez d'autres espèces de medaka comme *O. luzonensis* (Kondo *et al.*, 2009). Ainsi, chez ce dernier,

Phylogénie	Déterminisme du Sexe / Déclencheur	Ovaire	Testicule
	<u>Mammifères</u> XX:XY <i>Sry+/-</i>	<i>Sf1</i> (↓) <i>Sox9</i> (↓) <i>Wt1</i> (+) <i>Dmrt1</i> (↓) <i>Dax1</i> (↑) <i>Amh</i> (-)	<i>Sf1</i> (↑) <i>Sox9</i> (↑) <i>Wt1</i> (+) <i>Dmrt1</i> (↑) <i>Dax1</i> (↓) <i>Amh</i> (+)
	<u>Tortues</u> Température	<i>Sf1</i> (↓) <i>Sox9</i> (↓) <i>Wt1</i> (+) <i>Dmrt1</i> (↓) <i>Dax1</i> (↑) <i>Amh</i> (?)	<i>Sf1</i> (↑) <i>Sox9</i> (↑) <i>Wt1</i> (+) <i>Dmrt1</i> (↑) <i>Dax1</i> (↓) <i>Amh</i> (+)
	<u>Oiseaux</u> ZW:ZZ	<i>SF1</i> (↑) <i>SOX9</i> (↓) <i>WT1</i> (+) <i>DMRT1</i> (↓) <i>DAX1</i> (+) <i>AMH</i> (↓)	<i>SF1</i> (↓) <i>SOX9</i> (↑) <i>WT1</i> (+) <i>DMRT1</i> (↑) <i>DAX1</i> (+) <i>AMH</i> (↑)
	<u>Alligator</u> Température	<i>Sf1</i> (↓) <i>Sox9</i> (↑) <i>Wt1</i> (+) <i>Dmrt1</i> (↓) <i>Dax1</i> (+) <i>Amh</i> (-)	<i>Sf1</i> (↓) <i>Sox9</i> (↑) <i>Wt1</i> (+) <i>Dmrt1</i> (↑) <i>Dax1</i> (+) <i>Amh</i> (↑)

Figure 3 : Résumé de gènes liés à la différenciation gonadique dans un ovaire ou un testicule chez les reptiles par rapport à d'autres amniotes. Les relations phylogénétiques sont indiquées sur la gauche de la figure. Chez les mammifères et les oiseaux, le sexe gonadique est déterminé au moment de la fécondation par des gènes précis et indispensables (GSD). Chez certains reptiles, le sexe gonadique dépend de la température d'incubation des œufs (TSD). Cependant, plusieurs gènes sont connus pour être impliqués dans la différenciation sexuelle des gonades. Chez les mammifères, la présence ou l'absence de *Sry* détermine le sexe. La plupart des mêmes gènes semblent être impliqués dans la différenciation des gonades pour les espèces présentant GSD (mammifères et oiseaux) et TSD (tortues et crocodiles). Il est intéressant de noter que le profil d'expression de ces gènes semble refléter les relations phylogénétiques : les mammifères sont similaires aux tortues, et les oiseaux sont semblables aux crocodiliens. (+) indique la présence, (-) indique l'absence, (↑) indique une activation et (↓) indique une inhibition (d'après Modi & Crews, 2005).

le gène *gsdf^Y* (*gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome*) a remplacé *dmY* comme un gène maître de détermination du sexe mâle. En effet, l'expression de *gsdf^Y* est en aval de celle du *dmY* dans la cascade de détermination du sexe chez *O.latipes*, ce qui suggère que l'émergence de l'allèle *gsdf^Y*, indépendant de *dmrt1*, conduit à l'apparition de ce nouveau gène déterminant le sexe chez *O.luzonensis* (Myosho *et al.*, 2012). Une autre évolution de gène de la différenciation sexuelle mâle a récemment été découverte comme étant le déterminant majeur du sexe chez l'athérine de Patagonie, *Odontesthes hatcheri* : *amhY*. Il s'agit d'une duplication de l'hormone anti-müllérienne située sur le chromosome Y et exprimée bien avant l'*amh* autosomal (6 jours post-fécondation (jpf) vs 12 semaines post-fécondation) dans les cellules de Sertoli présomptives lors de la différenciation testiculaire (Hattori *et al.*, 2012). Par contre, le seul déterminant majeur ne correspondant pas à une duplication d'un gène de la différenciation du sexe est *sdY* (*sexually dimorphic on the Y chromosome*) découvert récemment chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*. C'est un gène exprimé uniquement dans le testicule, avec une expression prédominante lors de la différenciation testiculaire. Ainsi, l'inactivation ciblée de *sdY* chez les mâles induit la différenciation ovarienne, alors que la surexpression de *sdY* chez les femelles résulte de la différenciation testiculaire (Yano *et al.*, 2012). Par ailleurs, les analyses démontrent que *sdY* est un déterminant majeur du sexe conservé chez la plupart des espèces de salmonidés (Yano *et al.*, 2013).

Chez les reptiles, il existe une plasticité du déterminisme génétique du sexe (Modi & Crews, 2005; Sarre *et al.*, 2011). Ainsi, certains types de reptiles, comme les serpents et quelques lézards, présentent un déterminisme génétique et possèdent des chromosomes sexuels hétéromorphiques soit XX/XY ou ZZ/ZW (Ferguson-Smith, 2007). Aucun gène déterminant du sexe n'a encore été identifié chez les reptiles. Cependant, plusieurs gènes sont connus pour être impliqués dans la différenciation sexuelle des gonades (Shoemaker & Crews, 2009; Shoemaker-Daly *et al.*, 2010; Rhen & Schroeder, 2010; Angelopoulou *et al.*, 2012) (Figure 3). D'autres types des reptiles comme les alligators, les tortues et les crocodiles, ne possèdent aucun chromosome sexuel et ce sont les facteurs environnementaux qui déterminent leur sexe.

Cette plasticité du déterminisme génétique du sexe est aussi retrouvée chez les amphibiens (Nakamura, 2009, 2013). En effet, les deux types d'hétérogamétie, mâle XY et femelle ZW, existent chez les amphibiens (Schmid & Steinlein, 2001; Eggert, 2004; Nakamura, 2009). Ces deux systèmes hétérogamétiques peuvent être interchangeables. En effet, l'origine du sexe hétérogamétique était du sexe féminin, mais contrairement aux mammifères et les oiseaux, les chromosomes sexuels ont évolué plusieurs fois chez les amphibiens (Hayes, 1998; Nakamura,

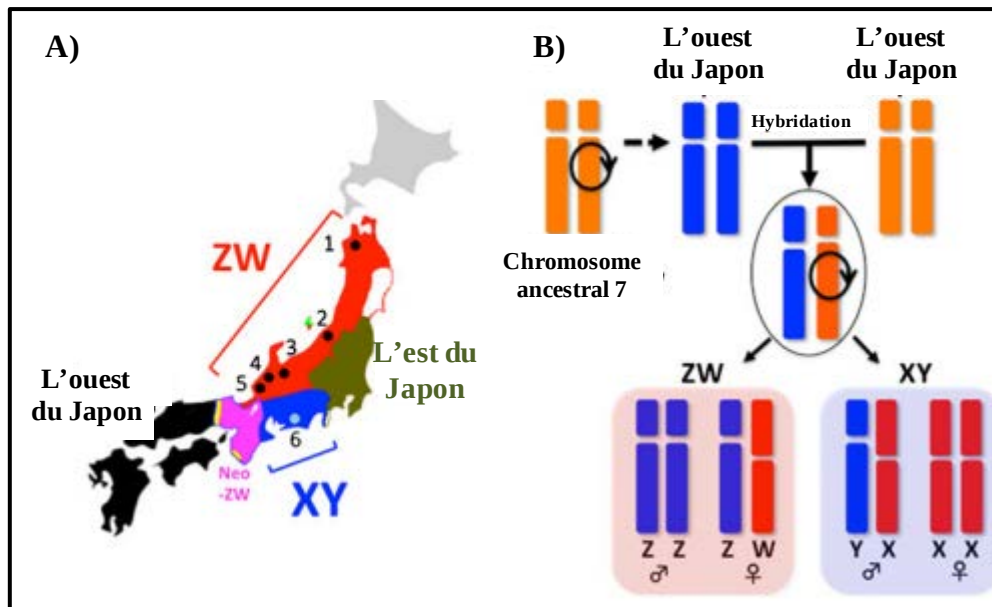


Figure 4 : Les chromosomes sexuels et localisations géographiques de *Rana rugosa*.

A) Localités géographiques de populations ZW et XY : la population du nord du Japon présente un système d'hétérogamétie femelle ZZ/ZW, alors que les populations de l'ouest, du centre et de l'est du Japon disposent d'un système d'hétérogamétie mâle XX/XY. Les numéros 1-6 présentent les villes utilisées comme origine d'échantillons étudiés. **B)** Evolution des chromosomes sexuels XY et ZW : les chromosomes Z et Y, affichés en bleu, partagent l'origine du chromosome 7 de la population de l'Ouest du Japon, tandis que les chromosomes W et X, indiqués en rouge, sont dérivés du chromosome 7 (en orange) de la population de l'Est du Japon. Une inversion péricentromérique, indiquée par un cercle avec une flèche, a eu lieu deux fois au cours de l'évolution des chromosomes 7, la première après l'émigration d'une population ancienne de la Corée à l'ouest du Japon, et la deuxième après une hybridation entre une population de l'est avec une autre de l'ouest du Japon (d'après Miura *et al.*, 2012).

2009). En plus, les deux systèmes d'hétérogamétie peuvent varier pas seulement entre les espèces d'amphibiens, mais aussi entre les populations d'une même espèce. C'est le cas chez la grenouille *Rana rugosa* qui présente la particularité de posséder les deux types de déterminisme du sexe XX/XY ou ZZ/ZW en fonction de la population locale au Japon. En fait, la population du nord du Japon présente un système d'hétérogamétie femelle ZZ/ZW, alors que les populations de l'ouest, du centre et de l'est du Japon disposent d'un système d'hétérogamétie mâle XX/XY (Figure 4A). Les chromosomes Z et Y partagent l'origine du chromosome 7 de la population de l'ouest du Japon, tandis que les chromosomes X et W sont dérivés du chromosome 7 de la population de l'est du Japon. Une inversion péracentromérique du chromosome 7 s'est produite indépendamment deux fois au cours de l'évolution des chromosomes, la première après l'émigration d'une population ancienne de la Corée à l'ouest du Japon, la deuxième après une hybridation entre une population de l'est avec une autre de l'ouest du Japon (Figure 4B) (Miura, 2007; Nakamura, 2013).

Un déterminant majeur potentiel a été identifié sur le chromosome W du xénope, *Xenopus laevis*, dont le déterminisme du sexe est contrôlé par les chromosomes ZZ/ZW ; il est appelé *dm-W* pour (*DM-domain gene on the W chromosome*) (Yoshimoto *et al.*, 2008) (Figure 2). L'expression de ce gène est transitoire et plus élevée pendant la détermination du sexe femelle. *dm-W* pourrait agir comme inhibiteur négatif dominant de l'effet masculinisant en empêchant la différenciation testiculaire, permettant ainsi le développement ovarien (Yoshimoto *et al.*, 2010). Il est bien de signaler que ce gène est un paralogue tronqué de *dmrt1*, un gène très conservé dans la fonction mâle chez de nombreux vertébrés (Yoshimoto *et al.*, 2008; Yoshimoto & Ito, 2011). D'ailleurs, de nombreux gènes impliqués dans la différenciation sexuelle ont été clonés chez les amphibiens, tels que *R. rugosa* ; *P. waltl* et *X. laevis* (Nakamura, 2009, 2010).

En dehors de ces gènes déterminants du sexe, les gènes de la différenciation des gonades semblent très conservés chez les différentes espèces de vertébrés.

Déterminisme environnemental du sexe ou ESD

Il est clair que des facteurs environnementaux peuvent influencer le devenir sexuel de l'embryon à un stade précis du développement chez plusieurs espèces, comme les reptiles (Georges *et al.*, 2010; Merchant-Larios & Díaz-Hernández, 2013), les amphibiens (Hayes, 1998; Nakamura, 2009) et certains poissons (Baroiller & D'Cotta, 2001; Baroiller *et al.*,

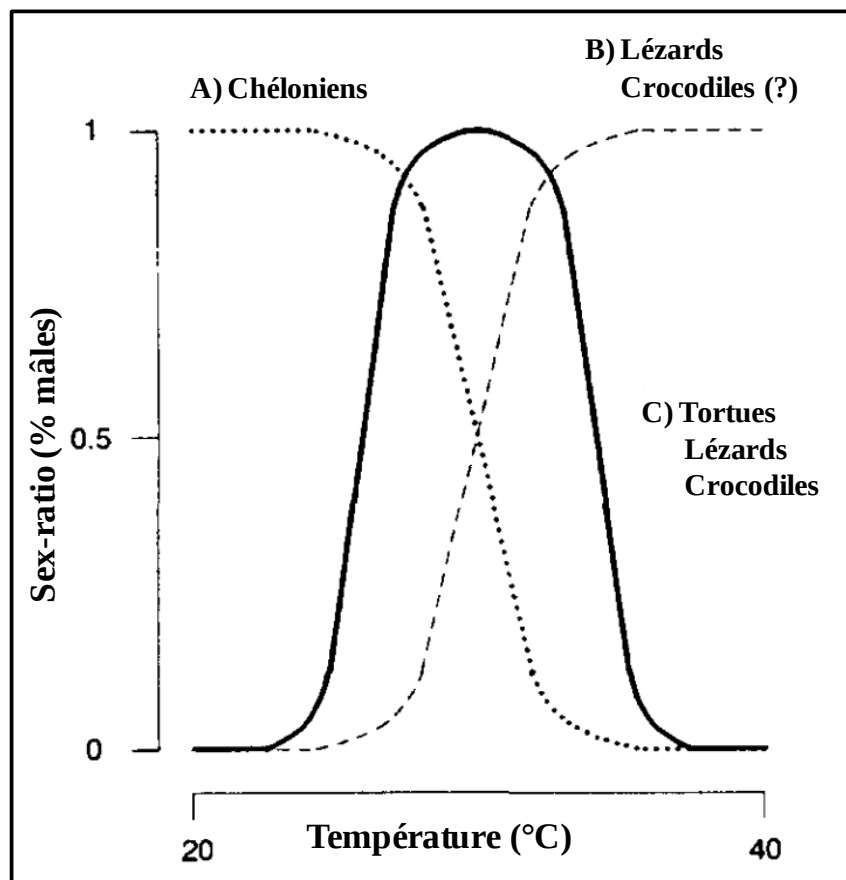


Figure 5 : Schéma représentant les trois types de réponse à la température chez les reptiles. A) Le mode « mâle-femelle » observé uniquement chez les Chéloniens : aux températures d'incubation basses on obtient des mâles. **B)** Le mode « femelle-mâle » observé chez les lézards et quelques alligators : les températures d'incubation basses donnent des femelles. **C)** Le mode «femelle-mâle-femelle)» rencontré chez les groupes précédents : aux températures d'incubation extrêmes, basses et hautes, on n'observe que des femelles et aux températures intermédiaires des mâles (d'après Ciofi & Swingland, 1997).

2009a). Ces facteurs peuvent être de différente nature : température, pH, ou encore facteurs sociaux.

La température est le facteur le plus étudié influençant les processus de différenciation sexuelle. Ce mécanisme thermosensible de déterminisme sexuel, appelé TSD (*Temperature Sex Determination*), dépend de la température d'incubation des œufs durant une période critique du développement embryonnaire : la période thermosensible ou TSP (*Thermo-Sensitive Period*). Cette sensibilité est essentiellement rencontrée chez de nombreux reptiles, tels que les crocodiles, la majorité des tortues et quelques espèces de lézards (Georges *et al.*, 2010). Chez ces espèces, trois principaux types de réponse à ce facteur ont été mis en évidence (Pieau, 1996). Le premier type, nommé « mâle-femelle (MF) » où les températures d'incubation basses donnent des mâles et les températures élevées des femelles. A une température pivot, on obtient 50% d'individus de chaque sexe. Le deuxième type, « femelle-mâle (FM) » qui donne l'inverse c'est à dire des femelles à température basse et des mâles à température élevée. Le dernier type, «femelle-mâle-femelle». Les femelles sont obtenues à températures basses et élevées tandis que les mâles sont générés par une température intermédiaire (Figure 5). Parfois, la modulation de la température n'aboutit pas à l'obtention de populations 100% mâles ou femelles, ce qui suggère une implication d'autres facteurs, génétiques et environnementaux, dans le déterminisme du sexe. Ainsi, une coexistence des déterminismes GSD et TSD a été mise en évidence chez différents lézards (Sarre *et al.*, 2011). Par exemple, chez l'Agame barbu (*P. vitticeps*), dont le déterminisme du sexe est contrôlé par un système ZZ/ZW, la température élevée peut inverser les mâles génotypiques ZZ en femelles phénotypiques sans avoir le chromosome W. De même, le scinque (*Bassiana duperreyi*), qui possède des chromosomes XY, peut être influencée par certaines températures en inversant les femelles XX en mâles (Quinn *et al.*, 2007; Radder *et al.*, 2008).

Cet effet s'est retrouvé également chez des espèces GSD comme certains poissons et amphibiens. Bien que ces espèces présentent un déterminisme génétique du sexe, la différenciation sexuelle peut être influencée par la température d'élevage. Ceci est le cas chez les poissons téléostéens, comme la capucette, *Menidia menidia*, le bar, *Dicentrarchus labrax* et le tilapia, *Oreochromis niloticus* (Conover & Heins, 1987; Piferrer *et al.*, 2005; Baroiller *et al.*, 2009a). Chez le medaka, qui présente un déterminisme génétique fort de type XX/XY, la température est capable de masculiniser les femelles génotypiques XX (Hattori *et al.*, 2007).

Chez les amphibiens, l'influence de la température a été illustrée chez différentes espèces. Chez l'amphibien *Triturus cristatus* par exemple, qui possède un déterminisme sexuel de type

XX/XY, les températures élevées conduisent à une sex-ratio déviée vers les mâles, par contre les températures basses conduisent à une féminisation (Wallace & Wallace, 2000). Les pleurodèles également, peuvent être influencés par la température. En effet, l'élevage des larves à une température élevée peut avoir un effet inverse d'une espèce à l'autre voisine, produisant 100 % de mâles phénotypiques chez *Pleurodeles waltl*, et 100 % de femelles phénotypiques chez *Pleurodeles poireti* (Dournon *et al.*, 1984a).

D'autres facteurs environnementaux peuvent influencer la sex-ratio, notamment chez les poissons (Baroiller & D'Cotta, 2001). A titre d'exemple, le pH peut agir seul ou au travers d'interactions avec la température sur la sex-ratio chez un genre de poisson, *Apistogramma* (Römer & Beisenherz, 1996). Nous pouvons aussi citer la photopériode ou encore la densité de population qui sont capables d'influencer le sexe chez le poisson *Lythrypnus dalli* (Rodgers *et al.*, 2007).

Généralités sur la différenciation gonadique chez les vertébrés

A la différence du déterminisme du sexe, il y a une grande conservation des processus de différenciation et de développement gonadique chez les vertébrés. D'une part, les gonades se composent des mêmes types cellulaires ; des cellules germinales (CG) associées à des cellules somatiques (DeFalco & Capel, 2009) classées en trois types : les cellules précurseurs des cellules dites «de support» se différencient en cellules de Sertoli chez les mâles et en cellules de la granulosa chez les femelles. Le deuxième type correspond aux cellules stéroïdogènes qui sont les cellules de Leydig chez les mâles et les cellules de la thèque interne ainsi que les cellules de la granulosa chez les femelles. Enfin, les cellules précurseurs des tissus de connexion donnent le tissu vasculaire, la tunique et les cellules myoïdes périvitellines chez le mâle et se différencient en tunique et cellules stromales chez la femelle.

D'autre part, au niveau moléculaire, on retrouve souvent les mêmes acteurs impliqués spécifiquement dans les voies de différenciation mâle ou femelle, parmi lesquels SOX9 (*Sry-related HMG box*), DMRT1, AMH (*Anti-Müllerian Hormone*) chez le mâle et FOXL2 (*Forkhead box L2*) chez la femelle, suggérant une certaine conservation de processus de différenciation des gonades au cours de l'évolution des vertébrés.

Chez les vertébrés, le testicule et l'ovaire se développent à partir d'une gonade embryonnaire bipotentielle. D'après la théorie de Witschi, outre les CG, la gonade serait composée de deux tissus différents : le cortex dérivé de l'épithélium coelomique et la médulla

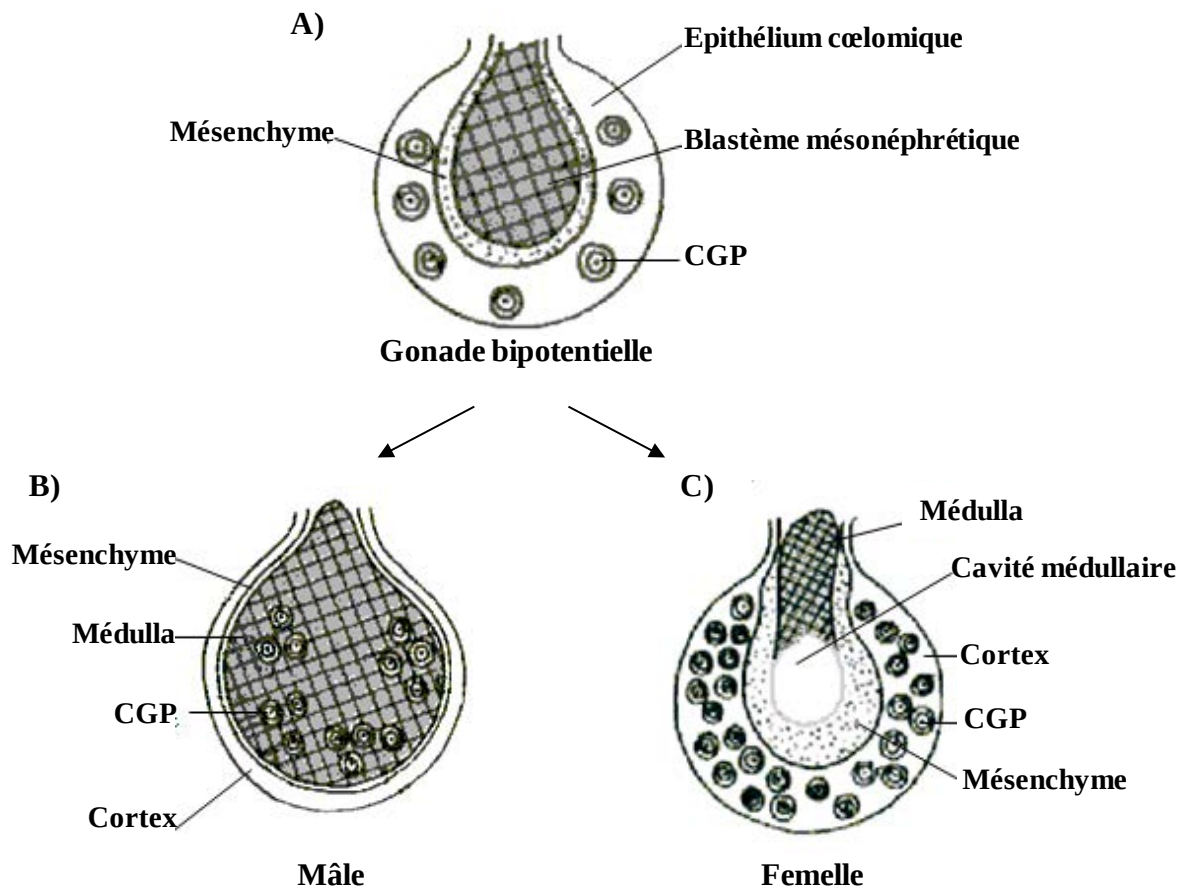


Figure 6 : Schéma de la différenciation d'une ébauche gonadique en testicule ou en ovaire. A) Gonade indifférenciée constituée d'un cortex issu de la prolifération de l'épithélium cœlomique colonisé par les CGP. Au centre, la prolifération du blastème mésonéphrétique donne naissance à la médulla. Cette dernière et le cortex sont séparés par un mésenchyme d'origine mésonéphrétique. B) Différenciation testiculaire : la médulla se développe et les CGP migrent du cortex vers la médulla. C) Différenciation ovarienne : le cortex se développe et la médulla dégénère conduisant à la formation d'une cavité (d'après Thibault *et al.*, 1998).

issue du blastème mésonéphrétique (Figure 6). Ceci est le cas chez la plupart des vertébrés sauf chez les cyclostomes et les poissons téléostéens où le blastème gonadique, dérivant de l'épithélium cœlomique seul, est homogène sans distinction cortex-medulla. Au cours de la différenciation gonadique mâle, le cortex régresse tandis que la médulla se développe et se différencie en cordons séminifères. Chez la femelle, au contraire, le cortex se développe et se différencie en structure ovarienne tandis que la médulla dégénère. La Figure 7 représente la différenciation gonadique chez différents vertébrés (DeFalco & Capel, 2009).

Une fois les gonades différenciées, la production d'hormones par les testicules ou les ovaires influence la différenciation sexuelle des mâles et femelles en donnant des caractères sexuels secondaires, y compris les canaux génitaux internes, les organes génitaux externes, et d'autres fonctionnalités à dimorphisme sexuel tels que la pigmentation et la taille du corps.

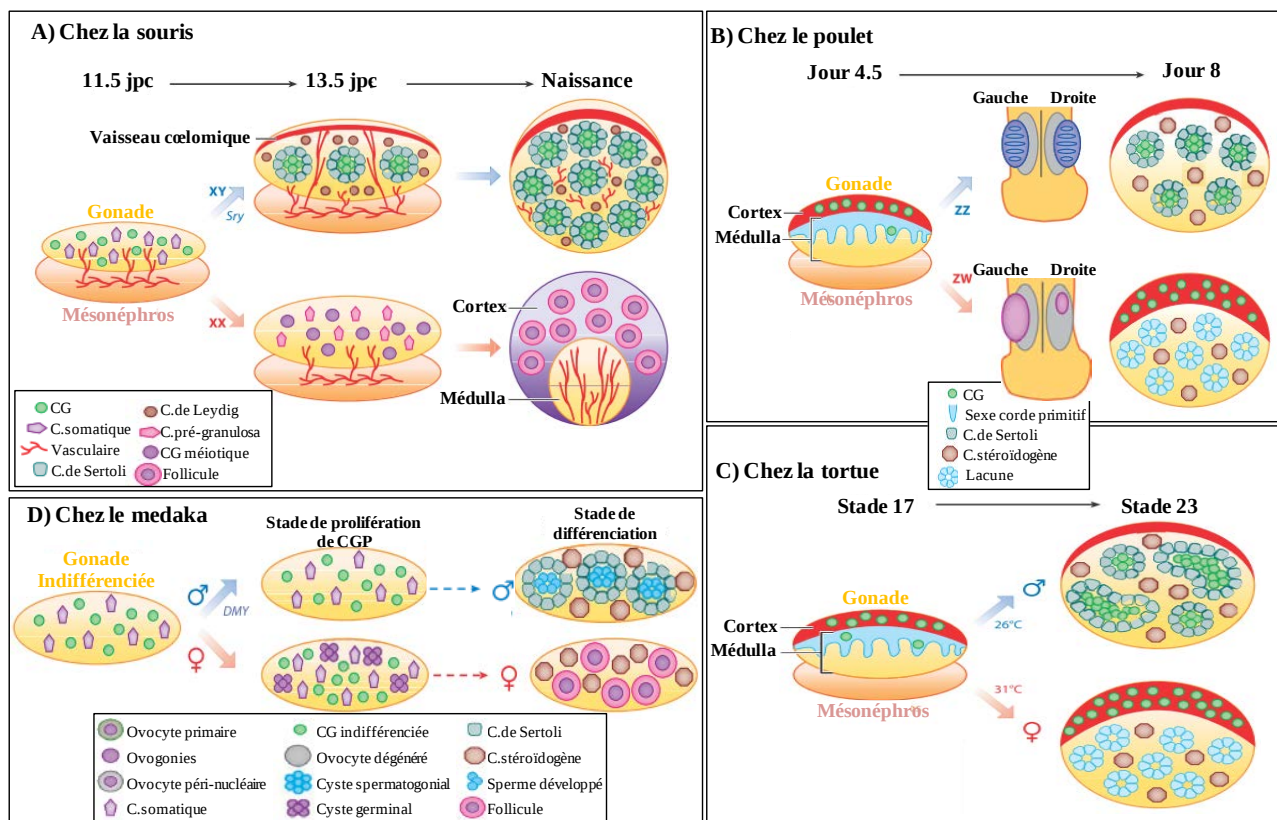


Figure 7 : Représentation schématique de la différenciation gonadique chez différents vertébrés. **A)** Chez la souris, l'expression de Sry dirige le développement de la gonade bipotentielle vers la voie testiculaire. Les caractéristiques de la morphologie testiculaire comprennent la formation des cordons testiculaires, le vaisseau cœlomique artériel, et les cellules de Leydig. Les caractéristiques de l'ovaire comprennent l'entrée en méiose des CG, la mise en place de domaines corticaux et médullaires, et la folliculogénèse. **B)** Chez le poulet, la gonade bipotentielle est compartimentée en cortex et médulla. Les cordons sexuels primitifs se transforment en cordons testiculaires dans la gonade mâle (ZZ), alors que des cavités appelées « lacunes » se présentent dans la gonade femelle (ZW). Seul l'ovaire gauche se développe. La zone corticale se développe dans l'ovaire, alors qu'elle régresse dans les testicules. **C)** Chez la tortue (*T. scripta*), l'incubation des œufs à 26°C produit des mâles (MPT), et conduit à la régression de la zone corticale, tandis que l'incubation à 31°C produit des femelles (FPT) et conduit au développement de la zone corticale. Les cordons sexuels primitifs sont en continuité avec l'épithélium cœlomique. Ils existent dans toutes les gonades au stade bipotentiel et deviennent des cordons testiculaires à la MPT et des lacunes à la FPT. **D)** Chez le poisson medaka, l'augmentation de la prolifération des CGP et la production de cystes germinaux sont les premiers indicateurs de la détermination du sexe femelle qui se produit avant tout dimorphisme sexuel somatique. Dans les testicules, la prolifération des CGP est beaucoup plus faible (d'après DeFalco & Capel, 2009).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I) Le Modèle d'étude : *Pleurodeles waltl*

I.1) Biologie et Développement

I.1.1. Principales caractéristiques biologiques et mode de reproduction

Pleurodeles waltl est un amphibien urodèle de la famille des salamandridés. Son aire de répartition est localisée en Afrique du sud, au sud du Portugal et de l'Espagne. Les larves et les adultes mènent une vie essentiellement aquatique; ils vivent dans des eaux calmes, mares ou rivières au cours lent. La longévité peut atteindre une dizaine d'années. Cette espèce a été utilisée comme modèle expérimental dans différents laboratoires européens au début du 20^{ème} siècle, afin d'étudier la régénération des membres, le développement embryonnaire ou encore la différenciation du sexe.

Le pleurodèle, comme bon nombre d'amphibiens, est capable, tant à l'état larvaire qu'à l'état adulte, de reconstituer la totalité de ses membres et de sa queue; il peut également régénérer des parties importantes de la tête comme l'extrémité du museau et de la mâchoire inférieure.

Le pleurodèle est une espèce gonochorique, avec un dimorphisme sexuel peu prononcé. En période de reproduction, le comportement sexuel chez les *Pleurodeles waltl* se caractérise par un amplexus dorso-ventral : le mâle se place sous la femelle et la saisit au niveau des membres antérieurs grâce à ses propres membres antérieurs (Joly, 1966). Des callosités au niveau des bras du mâle lui permettent de bien maintenir la femelle et les deux animaux vont nager plusieurs dizaines de minutes ensemble de cette façon. Le mâle va guider la femelle jusqu'à l'endroit où il a déposé un spermatophore (emballage de spermatozoïdes) qui sera absorbé par les lèvres cloacales de la femelle. La fécondation a donc lieu dans le cloaque de la femelle (fécondation interne). Les œufs, dont le nombre varie de 100 à 800, sont pondus en chapelets entourés chacun d'une gangue qui permet leur fixation sur des supports présents dans leur environnement.

Dans notre laboratoire, les animaux sont élevés dans l'eau du robinet à 20 ± 2 °C. La période de reproduction s'étale de Septembre à Avril. Pour les accouplements, un mâle et une femelle, sont installés dans des aquariums dont le fond est couvert de cailloux qui serviront de support pour les spermatophores déposés par le mâle puis pour les œufs déposés par la femelle.

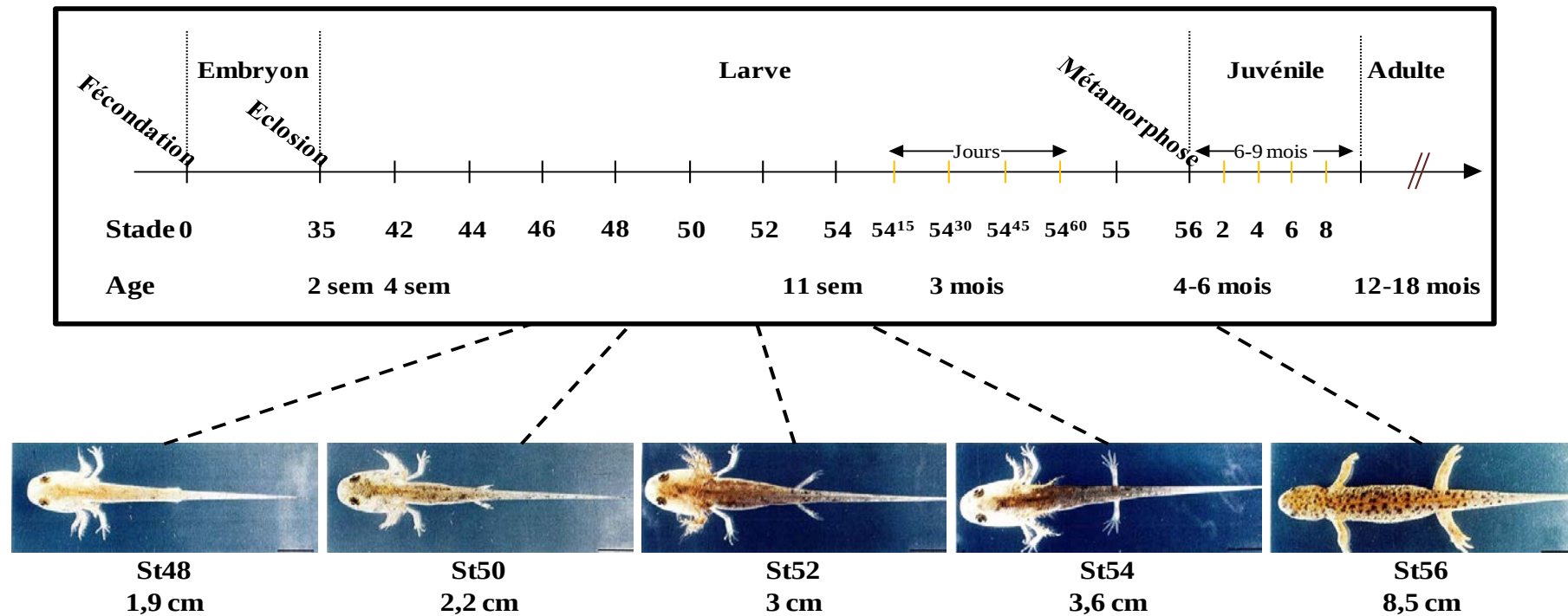


Figure 8 : Axe de développement du pleurodèle. Des larves aux stades 48 (membres postérieurs en forme V), 50 (membres postérieurs au début de leur formation), 52 (formation du 3^{ème} doigt aux membres postérieurs), et 54 (membres postérieurs entièrement formés) ainsi qu'un individu au stade 56 (métamorphose terminée ; les nageoires et les branchies à l'arrière de la tête ont complètement disparu) sont montrés et leur taille réelle est indiquée en dessous de la photographie (d'après Shi & Boucaut, 1995).

1.1.2. Développement morphologique; mode de vie et métamorphose

Le développement embryonnaire s'effectue dans l'eau, en dehors des voies maternelles, ce qui permet de suivre aisément l'évolution des embryons. Différents stades de développement, basés sur des critères morphologiques, ont été définis et répertoriés dans une table de développement (Gallien & Durocher, 1957). Après la fécondation, le développement embryonnaire dure environ deux semaines, jusqu'à l'éclosion qui survient au stade 35 (Figure 8). L'éclosion libère une larve appelée têtard qui mène une vie totalement aquatique. Elle présente des branchies externes à l'arrière de la tête et se déplace grâce à une nageoire caudale. La prise de nourriture débute au stade 38. Au laboratoire, les animaux sont d'abord nourris avec des larves d'artémies puis avec des larves de chironomes. Les stades 42 à 56 sont pour la plupart déterminés par le nombre de doigts présents au niveau des membres antérieurs puis postérieurs. Les larves sont assez petites: leur taille varie entre 1.5 cm pour le stade 42 et 7 cm pour le stade 55. La métamorphose se déroule pendant le stade 55. Les branchies disparaissent, la nageoire caudale régresse, la peau se kératinise, l'animal s'adapte peu à peu à un mode de vie amphibie. Le développement larvaire se termine au stade 56, la fin de la métamorphose étant marquée par la première mue de l'animal (Figure 8). Après cette période larvaire relativement longue (6-9 mois), l'alimentation est diversifiée : vers de farine, moules et cœur de bœuf. Les animaux passent ensuite par une phase juvénile assez longue (8 mois au minimum). Chez des individus mâles la spermatogenèse débute vers 8 mois, la maturité sexuelle est atteinte vers 12 mois et donc des mâles d'un an peuvent déjà s'accoupler et féconder des femelles. Par contre, la maturité sexuelle chez la femelle est un peu plus tardive ; elle se manifeste vers le 14^{ème} mois. La première ponte peut être escomptée au plus tôt à 16 mois (Gallien, 1967).

I.2. Déterminisme du sexe

Le pleurodèle présente un déterminisme génétique du sexe de type ZZ/ZW; où les femelles sont hétérogamétiques ZW. Dans les conditions d'élevage normales (20°C), le phénotype sexuel est conforme au sexe génétique et conduit à une sex-ratio de 1:1.

Ce type de déterminisme a été affirmé par les analyses des descendance issues de croisements entre individus normaux et individus dont le sexe avait été inversé après un traitement par des hormones sexuelles ou sous l'effet de la température (Gallien, 1955). Ainsi, l'homogamétie mâle ZZ a été démontrée à partir des expériences d'inversion sexuelle obtenue sous l'effet des œstrogènes (Gallien, 1950, 1951, 1954). En effet, après l'application de l'œstradiol (E₂) sur une ponte standard, les larves génétiquement mâles se développent en

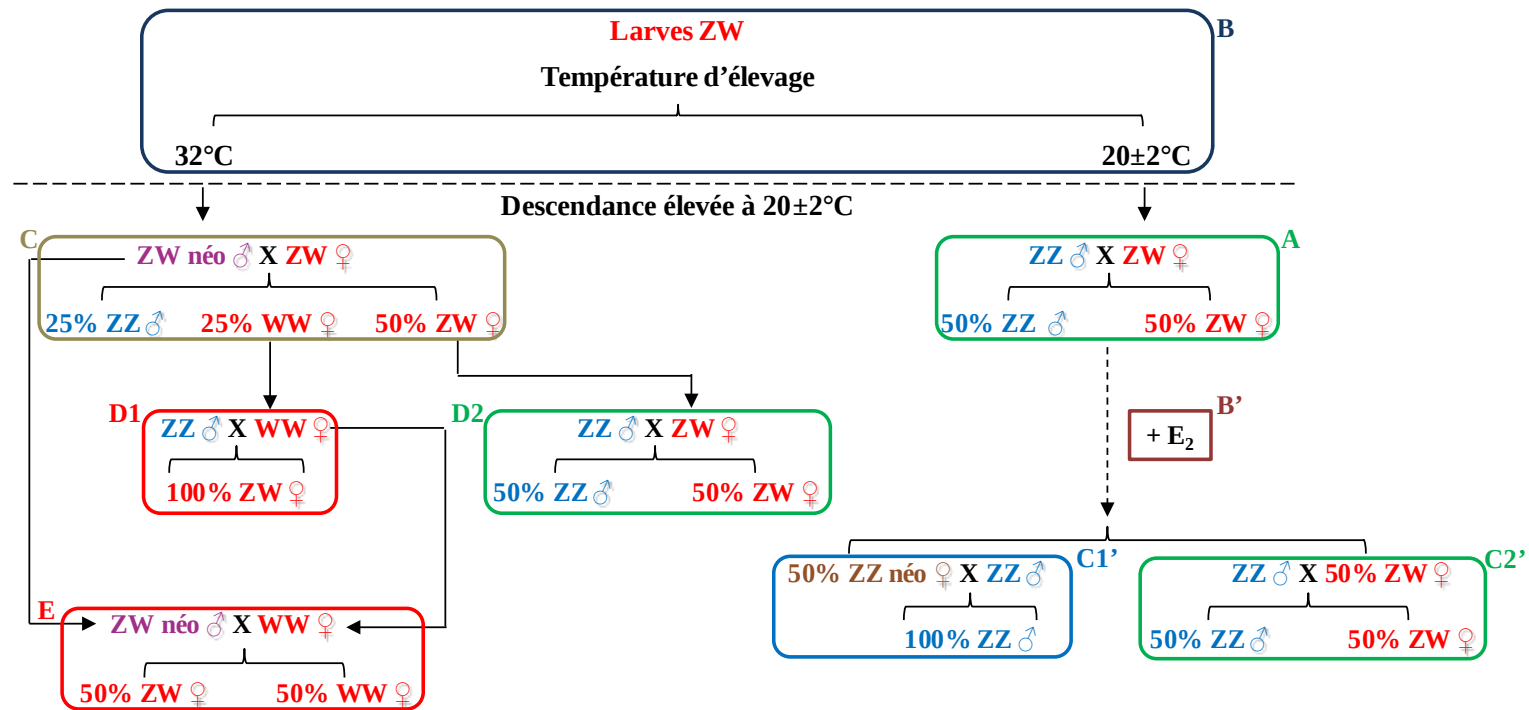


Figure 9 : Résumé des démarches expérimentales suivies pour la démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle ou mâle sous l'influence de la température ou des stéroïdes sexuels (E₂) chez le pleurodèle. Les pourcentages indiqués sont les pourcentages théoriques attendus dans les divers croisements (d'après Dournon *et al.*, 1984b; Dumond *et al.*, 2008a).

femelles phénotypiques (néo-femelle ZZ^{E2}). Le croisement de ces néo-femelles ZZ^{E2} avec des mâles standards ZZ produit une descendance unisexuée mâle ZZ (Gallien, 1951).

D'autre part, l'hétérogamétie femelle (ZW) a été confirmée après l'obtention d'une femelle à descendance unisexuée femelle, par la méthode des greffes de gonades embryonnaires prélevées au stade 24 (Collenot, 1973). En effet, une gonade primordiale de femelle ZW greffée chez un individu mâle ZZ se développe en un testicule fonctionnel. Ainsi, l'animal receveur du greffon contient une gonade mâle (néo-mâle ZW) et son croisement avec une femelle standard ZW présente, parmi leurs descendants, des femelles WW dites thélygènes. Ces dernières croisées avec des mâles standards ZZ donnent une descendance unisexuée femelle ZW (Collenot, 1973).

De plus, des néo-mâles ZW ont pu être obtenus par un traitement hyperthermique (30-32°C) appliqué aux larves génétiquement femelles (Dournon & Houillon, 1985). Le croisement de ces derniers avec des femelles standard ZW donne des descendance dont la sex-ratio est conforme aux prévisions théoriques: 25% de mâles (ZZ) et 75% de femelles. Parmi les femelles issues de ces croisements, deux tiers sont des femelles standard (ZW) et un tiers sont des femelles thélygènes WW (Dournon & Houillon, 1985; Dournon *et al.*, 1990a). Un résumé de toutes les possibilités de croisement est montré dans la figure 9.

Différentes méthodes ont été utilisées afin de montrer l'hétérogamétie au niveau chromosomique. L'analyse du caryotype mitotique, réalisé sur des larves de pleurodèle à partir de chromosomes en pro-métaphase a révélé 12 paires de chromosomes (Gallien *et al.*, 1965). Cependant, les chromosomes sexuels mitotiques ne présentent pas d'hétéromorphisme (Gallien *et al.*, 1966). Des analyses ont aussi été faites sur les chromosomes méiotiques d'ovocytes I. Ces chromosomes sont dits en écouvillon de par la présence d'expansions latérales ou puffs qui sont des zones où a lieu la transcription (Lacroix, 1968). Des boucles hétéromorphiques ont été observées sur le bivalent IV qui est la paire d'hétérochromosomes Z et W. Ces boucles sont révélées par immuno-détection avec un anticorps monoclonal qui marque les chromosomes en écouvillon (Lacroix *et al.*, 1985), ou par hybridation *in situ* (HIS) avec des sondes d'acide ribonucléique (ARN) qui semblent se fixer sur des protéines spécifiques du chromosome W (Penrad-Mobayed *et al.*, 1998).

Les analyses de descendance tétraploïde issue du croisement entre mâle diploïde ZZ et femelle triploïde ZZW fertiles ont démontré que le chromosome sexuel W joue un rôle dominant dans la détermination sexuelle (Lacroix *et al.*, 1990). Cependant, l'obtention de néo-femelles ZZ et de néo-mâles ZW fertiles suggère que les facteurs contrôlant la

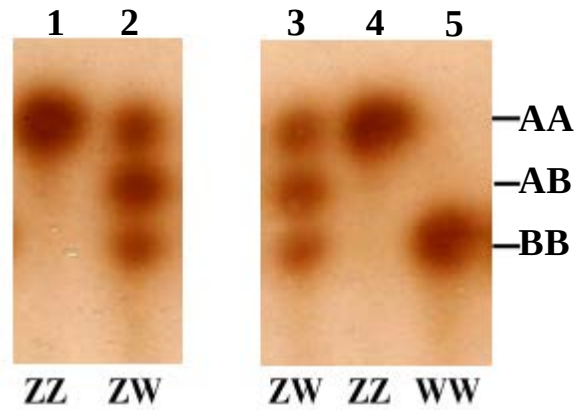


Figure 10 : Profil électrophorétique sur gel d'amidon de l'enzyme peptidase-1 liée au sexe. La présence de dimères AA est caractéristique d'un génotype mâle $Z^A Z^A$ (piste1). La présence de dimères AA, AB et BB est typique d'un génotype femelle $Z^A W^B$ (piste 2). L'enzyme est également un excellent marqueur du génotype sexuel pour les animaux inversés sexuellement. Ainsi, piste 3, on peut observer un néo-mâle (ZW^{32}) obtenu par augmentation de la température d'élevage. La piste 4 correspond à une néo-femelle (ZZ^{E2}) obtenue après un traitement à l' E_2 . Enfin, la piste 5 correspond à une femelle thélygène $W^B W^B$ obtenue par croisement entre une femelle standard ZW et un néo-mâle ZW.

spermatogenèse et l'ovogenèse sont autosomaux et ne sont pas localisés sur la région déterminante du chromosome W.

Depuis quelques années, le génotype sexuel chez le pleurodèle est déterminé par l'analyse du profil électrophorétique de la peptidase-1. Il s'agit d'une enzyme dimérique codée par deux gènes codominants liés aux chromosomes sexuels. Le gène codant la sous-unité peptidase A est lié au chromosome Z et le gène codant la sous-unité peptidase B ou β est lié au chromosome W (Ferrier *et al.*, 1983). Chez les individus ZZ, seules des sous-unités A sont synthétisées et seuls des homodimères AA vont se former. Chez les individus ZW, les sous-unités A et B sont produites dans la même cellule et elles s'associeront soit en homo-dimères AA et BB soit en hétéro-dimères AB. La peptidase 1 s'exprime dans tous les tissus et le sexage des larves peut être réalisé facilement par électrophorèse non dénaturante à partir d'une biopsie caudale. Ce marqueur des chromosomes sexuels peut aussi permettre d'identifier les individus WW chez lesquels ne se forment que des homodimères BB (Figure 10).

I.3. Différenciation gonadique

I.3.1. Origine des cellules germinales chez le pleurodèle

Des études expérimentales menées par plusieurs équipes de recherche, ont montré que les précurseurs des cellules germinales primordiales (CGP) chez les salamandres y compris le pleurodèle, comme chez les mammifères, se développent au niveau du mésoderme suite à un phénomène d'induction (Wakahara, 1996; Dumond *et al.*, 2008a) Par exemple, des cultures de parties ventrales ou ventro-latérales d'embryons au stade blastula dans le blastocoele de jeunes gastrulas ont démontré que les précurseurs des CGP sont localisés dans le mésoderme présomptif (Maufroid & Capuron, 1973). Lorsque l'ectoderme et l'endoderme de jeunes gastrulas sont associés et cultivés *in vitro*, l'endoderme dorsal induit principalement de la chorde, des somites et des tubules pronéphrétiques alors que l'endoderme ventral induit la différenciation de tubules pronéphrétiques, de mésenchyme et de CGP (Maufroid & Capuron, 1977a, 1977b). En effet, les CGP sont spécifiées à partir des cellules de la région latérale du mésoderme sous l'influence de signaux produits par l'endoderme durant la gastrulation (McLaren, 2003; Extavour & Akam, 2003). Ainsi, puisque la notochorde différenciée sécrète plusieurs antagonistes de « *Bone Morphogenetic Proteins* » BMPs (chordin, noggin et follistatin), la spécification de CGP chez les urodèles pourrait être un processus dépendant des BMPs, comme chez les mammifères (Dumond *et al.*, 2008a). Ces signaux stimulent, en plus,

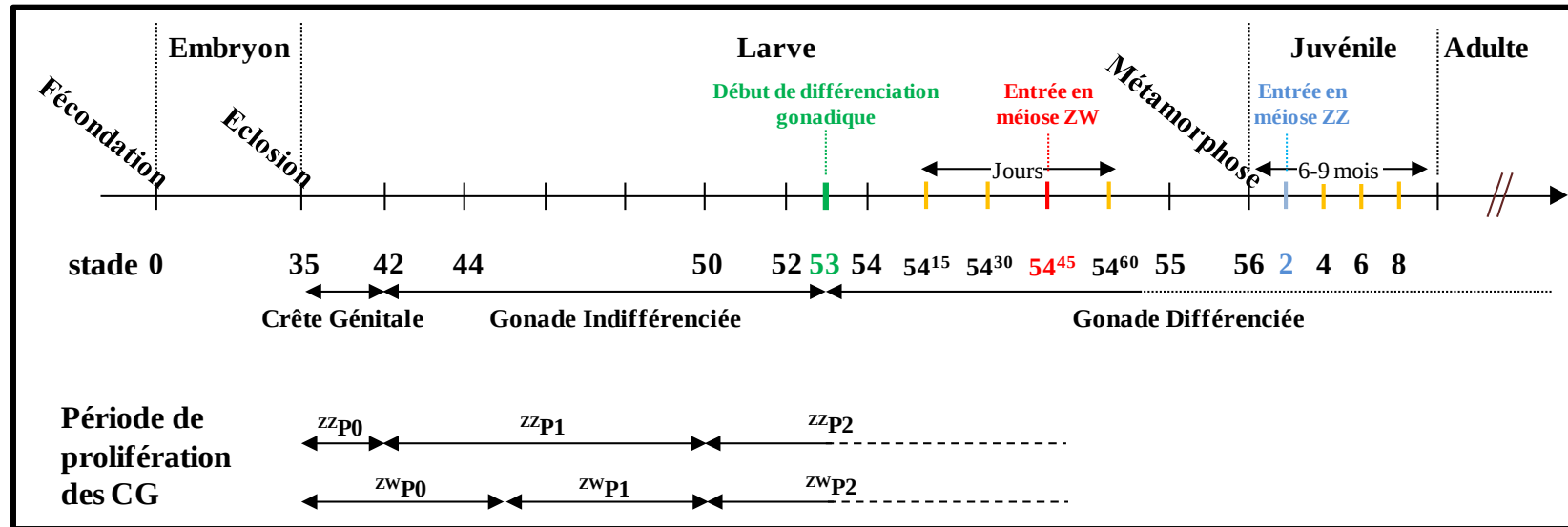


Figure 11 : Table de développement du pleurodèle. Les stades de la crête génitale, de la gonade indifférenciée, et de la gonade différenciée sont indiqués. P0, P1, P2 représentent les périodes de prolifération des CG. Le moment de l'entrée en méiose chez les individus mâles (ZZ) et femelles (ZW) sont aussi présentés (d'après Dournon *et al.*, 1990; Wallacides *et al.*, 2009).

la formation d'autres types de cellules somatiques mésodermiques comme le mésonéphros et les cellules sanguines, d'où leur nom : « *Mesoderm Inducing Factors* » (Johnson *et al.*, 2003).

Contrairement aux amphibiens anoures chez lesquels la ségrégation de la lignée germinale se fait par des déterminants d'origine maternelle présents dans le cytoplasme des ovocytes, chez le pleurodèle, la ségrégation des CGP se fait selon le mode épigénétique par interactions cellulaires au cours du développement embryonnaire. L'association d'ectoderme avec de l'endoderme ventral d'embryons de différents stades a permis de déterminer la période durant laquelle s'effectue la ségrégation de la lignée germinale (Maufroid & Capuron, 1977b). Elle débute au stade 8a (gastrulation) et elle est définitive au stade 13 (neurulation) (Dumond *et al.*, 2008a).

I.3.2. Formation de la crête génitale et établissement des gonades indifférenciées

Chez les urodèles, les gonades vont apparaître sur la face ventrale du mésonéphros. Les CGP apparaissent postérieurement dans une région extra-gonadique représentée par le mésoderme latéral, puis elles migrent pour coloniser la somatopleure et constituent une crête génitale. La migration a lieu entre les stades 35 et 41. Elle se fait le long du mésentère dorsal et les CG sont identifiables par leur grande taille, leur noyau polylobé et le fait qu'elles conservent des plaquettes vitellines plus longtemps que les cellules somatiques. Les gonades sexuellement indifférenciées se forment à partir du stade 42 (Figure 11) (Dournon *et al.*, 1989). A ce stade, les CG prolifèrent dans la cavité cœlomique avec quelques cellules somatiques de la crête génitale. Au stade 45, plus de cellules somatiques constituent un pédicule à partir duquel les CG sont suspendues. Au stade 50, l'ébauche gonadique se sépare en deux parties: le corps gras dépourvu de CG et la gonade elle-même. La gonade indifférenciée comporte à la périphérie un cortex, dérivé de l'épithélium cœlomique, comprenant des cellules somatiques et les CG, et au centre une médulla qui est dérivée du blastème mésonéphrétique et initialement dépourvue de CG (Figure 11) (Dumond *et al.*, 2008a).

I.3.3. La prolifération des cellules germinales primordiales

La prolifération des CG a été étudiée pendant la vie larvaire chez le pleurodèle par la détermination de l'indice mitotique et comptage des CG (Dournon *et al.*, 1989, 1990b). Trois périodes ont été distinguées (Figure 11). Une période P0 où les CGP colonisant les crêtes génitales ne prolifèrent pas pendant deux semaines, une période P1 caractérisée par une prolifération modérée et une période P2 avec un taux plus élevé de prolifération. Chez les

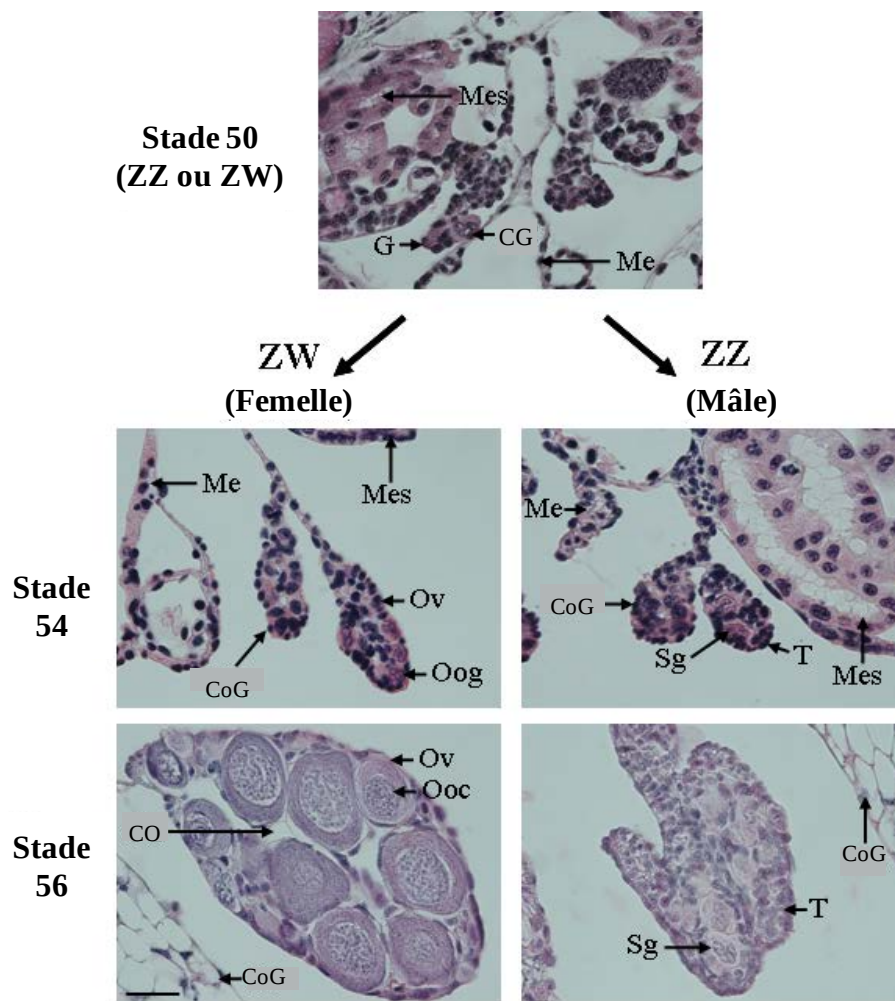


Figure 12 : Développement gonadique durant la vie larvaire chez le pleurodèle. Au stade 50, la gonade est indifférenciée et a le même aspect dans les deux sexes : C'est un petit organe longitudinal de chaque côté du mésentère (Me) près du mésonéphros (Mes) qui contient un peu de CG corticales. Au stade 54, l'ovaire (Ov) est caractérisé par les ovogonies (Oog) situées dans le cortex de la gonade dont la cavité ovarienne (CO) commence à se former, alors que le testicule contient des spermatogonies (Sg) dans la médulla. Dans les deux cas, la différenciation du corps gras (CoG) a commencé. Au stade 56 (la fin de la métamorphose), l'ovaire contient plusieurs ovocytes (Ooc) qui sont entrés en prophase I de la méiose et ont commencé à accumuler du vitellus; la cavité ovarienne est bien développée. En revanche, le testicule contient encore des spermatogonies (Sg) (pas encore entrées méiose); dans la médulla, ces cellules se trouvent dans les lobules et constituent des cystes. Le corps gras est bien différencié chez les deux types de larves ZZ et ZW. Barre = 50 μ m; toutes les images ont été obtenues au même grossissement (d'après Flament *et al.*, 2011).

larves ZZ, P0 se termine au stade 41, alors que chez les larves ZW cette période s'étend jusqu'au stade 45. Puis P1 démarre à la fois chez les larves ZZ et ZW jusqu'au stade 50. Vu que la période P0 est plus longue chez les ZW que les ZZ, le nombre des CG à la fin de la période P1 est un peu plus faible chez les individus ZW que chez les ZZ. Ensuite, le taux de prolifération s'accélère pendant la phase P2 chez les deux sexes. Cependant les larves ZW possèdent un plus grand nombre de CG (634 ± 95) que les larves ZZ (489 ± 56) au stade 53 où la différenciation gonadique débute (Dournon *et al.*, 1990b). Par ailleurs, le nombre des CG pendant les stades plus avancés a été étudié dans le cadre des parabioses (voir partie I.4.3). Ainsi, au stade 54+60 jours (j) où l'entrée en méiose se produit chez les larves ZW, ce nombre est beaucoup plus élevé chez les parabiontes ZW/ZW (547 ± 109) que les parabiontes ZZ/ZZ (205 ± 48) (Dumond *et al.*, 2008b).

L'effet de la température sur la prolifération des CG a également été étudié (Dournon *et al.*, 1990b). Au stade 53, les larves ZW³² possèdent un nombre de CG inférieur à celui des femelles standard ZW²⁰.

I.3.4. Caractéristiques histologiques des gonades différenciées

Par analyse histologique, le premier signe de la différenciation des gonades est détecté au stade 53. Durant la différenciation ovarienne les CG se maintiennent dans le cortex de la gonade où elles prolifèrent. Au stade 54, ces cellules s'associent avec des cellules somatiques et constituent des follicules. La dégénérescence médullaire aboutit au même stade à la formation d'un ovaire creux avec une cavité centrale (Figure 12).

Au contraire, pendant la différenciation testiculaire, les CG quittent le cortex pour coloniser la médulla tandis que le cortex se réduit et participe à l'élaboration de l'albuginée (Figure 12). Il est à noter que la différenciation de la gonade mâle sera ensuite régionalisée: un premier lobe se différenciera en position caudale ou postérieure tandis que la partie antérieure emballée par un tissu conjonctif qui entoure aussi le poumon restera indifférenciée (Figure 13). Le lobe différencié contient différents lobules au sein desquels les CG s'associent à des cellules de Sertoli pour constituer des cystes dans lesquels la méiose s'effectuera de manière synchrone (Figure 12). Le testicule du pleurodèle comme celui des urodèles est qualifié de testicule multiple car plusieurs lobes se formeront successivement chez l'adulte, à l'arrière du lobe précédent (Flament *et al.*, 2009).

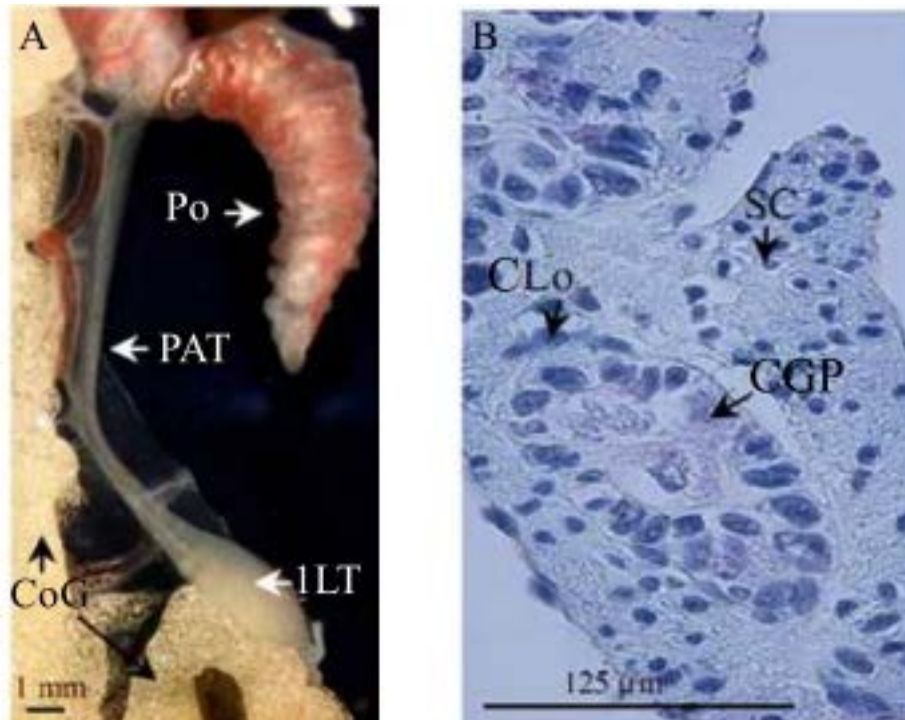


Figure 13 : Association entre le poumon et le testicule chez le pleurodèle. **A)** Le testicule d'un individu âgé de 9,5 mois est constitué de deux parties : la partie antérieure du testicule (PAT) attachée au poumon (Po) et la partie postérieure qui présente le premier lobe testiculaire (1LT). Le corps gras (CoG) associé au testicule est bien développé. **B)** Coupe histologique dans la partie antérieure du testicule attachée au poumon qui montre des lobules constitués de cellules lobulaires (CLO) qui renferment des CGP. Ces cellules sont reconnaissables à leur grande taille et à leur grand noyau polylobé. À l'extérieur du lobule, le cortex renferme des cellules somatiques (SC) qui possèdent des noyaux très petits (d'après Flament *et al.*, 2009).

I.3.5. Entrée en méiose et gamétogenèse

I.3.5.1. Entrée en méiose

L'entrée en méiose des CG chez *Pleurodeles waltl* a été détectée par l'expression d'un marqueur de la méiose *Pwdmc1* (*Disrupted Meiotic cDNA 1*) représentant le seul marqueur de la méiose cloné chez cette espèce. Les travaux de Wallacides *et al.* ont montré chez les femelles un signal de *Pwdmc1* dès le stade 54+45j qui reste ensuite maintenu chez les juvéniles. En revanche, chez les mâles, l'expression de *Pwdmc1* n'est détectée qu'à la 8ème semaine après la métamorphose et se maintient chez les juvéniles (Figure 11). Par ailleurs, un signal de *Pwdmc1* a été détecté aux stades 50 chez les femelles et au stade 54 chez les mâles dans des complexes gonades-mésonephros (GM) prélevés et traités pendant deux jours par 2 μ M d'acide rétinoïque (AcR), suggérant qu'*in vitro*, l'ajout d'AcR induit une entrée en méiose précoce des CG chez les deux sexes (Wallacides *et al.*, 2009).

Pour comprendre le rôle de l'AcR dans l'entrée en méiose, le métabolisme de l'AcR et plus précisément l'expression des enzymes PwRaldh2 (*Retinaldehyde Dehydrogenase 2*) et PwCyp26b1 (*Cytochrome P450 isoforme 26 B1*) qui synthétisent et dégradent l'AcR respectivement a été étudié *in vivo* et *in vitro*. L'analyse protéique montre que PwRaldh2 est exprimée dans les complexes GM des deux sexes au même niveau aux stades 54 et 54+60j (qui représentent respectivement des stades antérieurs et postérieurs à l'entrée en méiose chez la femelle). L'expression de PwCyp26b1 montre une expression similaire chez les deux sexes dans les complexes GM au stade 54 mais son expression diminue chez la femelle au stade 54+60j pendant lequel les CG sont en méiose. Ceci suggère une accumulation d'AcR qui va induire l'entrée en méiose chez la femelle. Au stade 56 (deux mois avant l'entrée en méiose chez le mâle), l'expression de PwCyp26b1 n'est pas détectée dans l'ovaire alors qu'une expression est détectée chez le mâle. D'ailleurs, *in vitro*, le traitement par R115866 (inhibiteur de CYP26B1) des complexes GM prélevés au stade 54 chez le mâle induit une entrée en méiose précoce des CG. Cela suggère que la dégradation de l'AcR par PwCyp26b1 pourrait être responsable du retard d'entrée en méiose chez le mâle. Ces résultats sont confirmés par des expériences réalisées chez la femelle. Le traitement des complexes GM prélevés au stade 54+90j, où les CG sont déjà entrées en méiose, par le Citral (inhibiteur de RALDH) pendant deux jours inhibe l'expression de *Pwdmc1* (Wallacides *et al.*, 2009).

En outre, il a été montré que l'entrée en méiose se produit chez les larves ZZ traitées par l'E₂ en même temps que les femelles normales, alors qu'il est reporté après la métamorphose

chez les larves ZW traitées par la dihydrotestostérone (DHT). Par conséquent, une inversion de sexe hormono-dépendante peut non seulement favoriser la réorganisation du compartiment somatique des gonades mais aussi influencer le processus de différenciation des CG, au moins, par la modulation du métabolisme de l'AcR. Enfin, l'ensemble de ces résultats indique que l'induction de l'entrée en méiose des CG par l'AcR pourrait être un mécanisme de différenciation des CG conservé chez les vertébrés, ainsi qu'il suggère que la biosynthèse de l'AcR pourrait être régulée par les stéroïdes dans les gonades d'amphibien urodèle (Wallacides *et al.*, 2009).

I.3.5.2. Gamétogenèse

I.3.5.2.1. Ovogenèse

L'ovogenèse, le processus de différenciation des ovocytes permettant d'obtenir des ovules, se compose de quatre étapes majeures, suite aux multiplications goniales:

- la prévitellogenèse, qui commence lors de l'entrée en prophase de la première division méiotique et qui s'arrête au stade diplotène, se caractérise notamment par une croissance de l'ovocyte et la mise en place du follicule ovarien.
- la vitellogenèse, phase de forte croissance durant laquelle l'ovocyte va accumuler des réserves vitellines produite par les cellules hépatiques, qui seront utilisées pour le développement autonome de l'embryon.
- la maturation ovocytaire, caractérisée par la reprise de la méiose et l'évolution jusqu'en métaphase II.
- l'ovulation lors de laquelle les ovocytes mûrs (arrêtés en métaphase II) sont libérés dans la cavité générale, et c'est la fécondation qui lèvera le blocage métaphasique et permettra l'achèvement du processus méiotique.

L'entrée en méiose a aussi été étudiée au cours de l'année chez des femelles adultes (18 mois). Il a été constaté, en mesurant l'expression de *PwDmc1*, une reprise de cette expression en dehors de la saison de reproduction (mai à septembre). Ceci suggère que la femelle renouvelle son stock d'ovocytes pendant l'été pour la prochaine saison de reproduction. L'ovogenèse est un processus continu chez les amphibiens, et le stock germinale se renouvelle chez l'animal adulte par multiplication des ovogonies (Wallacides *et al.*, 2009).

I.3.5.2.2. Spermatogenèse

A la fin de la vie larvaire (stade 56), les CG possèdent un grand noyau polylobé typique des CG non encore entrées en méiose. Après la métamorphose et au cours de la vie adulte, la spermatogenèse se déroulera de façon synchrone au sein d'un même cyste.

Chez le mâle, il a été montré que l'entrée en méiose des CG débute deux mois après la métamorphose. Cela est attesté par l'expression d'un orthologue de *Dmc1*, codant une recombinaison marqueur de la méiose (*PwDmc1*). A ce stade, l'étude histologique montre qu'apparaissent dans la partie postérieure du testicule (ébauche du premier lobe), des CG à noyau rond avec une chromatine condensée (Wallacides *et al.*, 2009). En revanche, les CGP localisées dans la partie antérieure du testicule attachée au poumon, n'entrent pas en méiose à ce stade : l'expression de *Pwdmc1* n'est pas détectée dans cette partie chez les juvéniles et les jeunes adultes et les CG y conservent leur morphologie typique avec un grand noyau polylobé (Flament *et al.*, 2009).

Le pleurodèle est un amphibien à reproduction saisonnière (septembre à mai). L'entrée en méiose des CG a été étudiée afin de vérifier la présence d'un cycle saisonnier. L'analyse au cours de l'année de l'expression de *Pwdmc1* chez des individus mâles adultes (18 mois) a montré que des CG méiotiques sont présentes pendant toute la saison de reproduction.

Par ailleurs, l'aspect du lobe testiculaire évolue au cours de l'année: la maturation des CG dans le testicule des urodèles évolue de façon céphalo-caudale (Pierantoni *et al.*, 2002). En été et jusqu'à fin septembre, le testicule est constitué des deux régions: une région grise dite immature située dans la partie antérieure du lobe contenant des spermatogonies et des spermatocytes; une région blanche dite mûre qui occupe la partie postérieure du lobe et renferme des cystes pleins de spermatozoïdes. Au début de la saison de reproduction, l'évacuation des spermatozoïdes vide la partie postérieure de la région mûre qui se transforme en tissu glandulaire aisément reconnaissable à sa couleur orangée. On y rencontre encore des CG à noyau polylobé notamment le long des canaux efférents.

À l'âge de trois ans, le testicule continue sa différenciation et développe un deuxième lobe à partir de ces CG résiduelles localisées dans le tissu glandulaire.

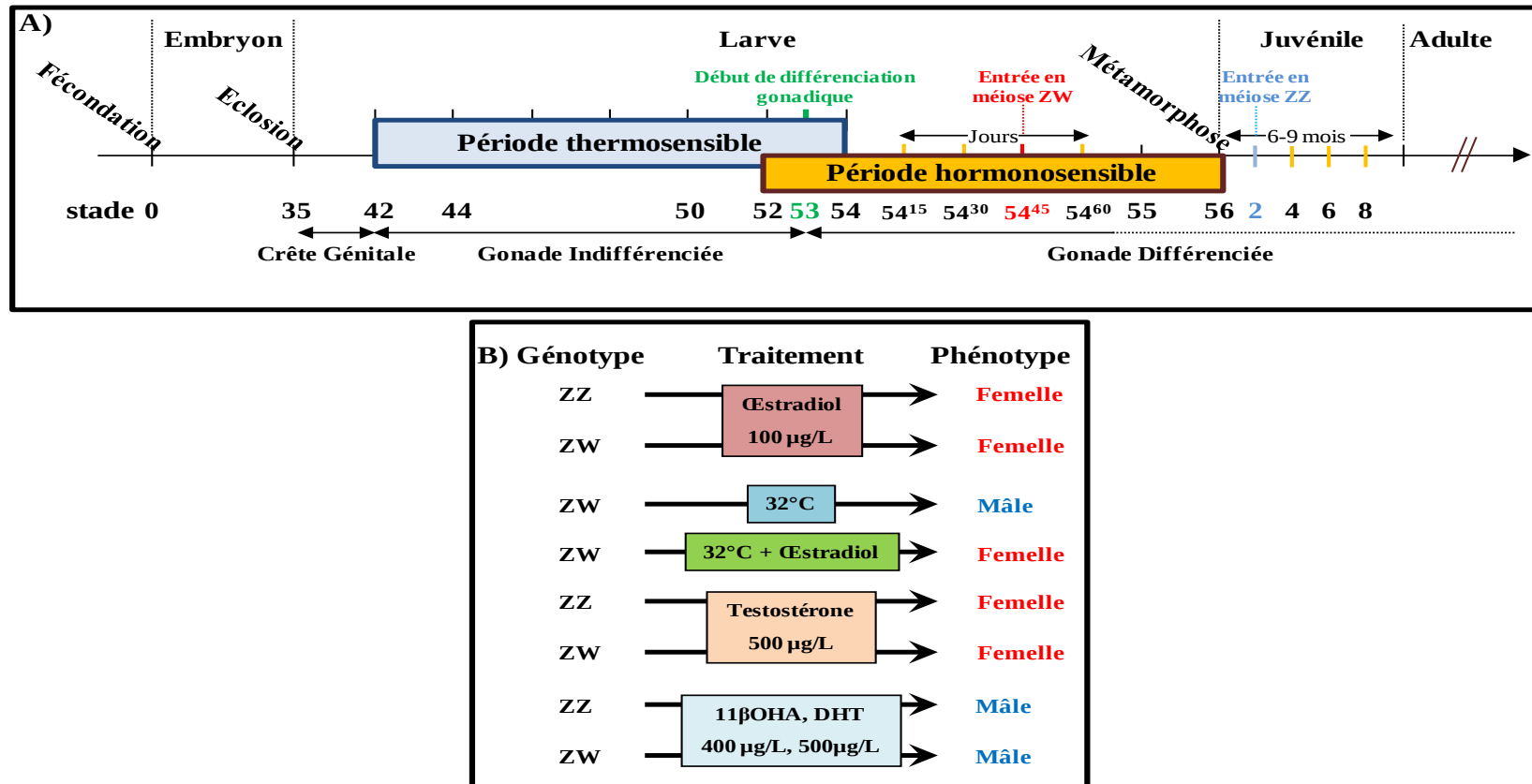


Figure 14 : Table de développement du pleurodèle. **A)** La période thermosensible s'étend du stade 42 jusqu'au stade 54. Durant cette période, des larves femelles génétiques ZW élevées à 32°C se développent comme des mâles phénotypiques. La période hormonosensible s'étend du stade 52 au stade 56. **B)** Résumé des effets de traitements visant à inverser le sexe des larves de pleurodèle. Après le traitement, le génotype a été déterminé par l'analyse de la peptidase-1, et le phénotype a été déterminé après la métamorphose par l'examen morphologique et histologique (d'après Dumond *et al.*, 2008a).

I.4. Modifications de la différenciation sexuelle

Malgré le déterminisme génétique chez le pleurodèle, la différenciation du sexe peut être modifiée sous l'influence de facteurs externes (environnementaux) comme la température d'élevage ou les hormones sexuelles exogènes.

I.4.1. Influence de la température

L'action de la température d'élevage sur le développement des amphibiens a été beaucoup étudiée. Witschi a constaté qu'une température de 32°C, anormalement élevée, modifiait la différenciation des gonades de *Rana temporaria* et de *Rana sylvatica*. A sa suite, le cas d'autres anoures ont aussi été étudiés : *Rana temporaria* et *Bufo vulgaris*, *Rana japonica*, *Rana catesbeiana*, ainsi que trois espèces de salamandres: *Hynobius retardatus*, *Pleurodeles poireti* et *Pleurodeles waltl*. Les températures élevées produisent 100% de mâles chez les grenouilles, alors que chez les salamandres, ces températures peuvent avoir un effet contraire d'une espèce à l'autre, induisant le développement de femelles phénotypiques chez *Pleurodeles poireti*, et de mâles phénotypiques chez *Hynobius retardatus* et *Pleurodeles waltl* (Hayes, 1998; Eggert, 2004; Nakamura, 2013).

D'une manière générale, les températures ambiantes qui varient entre 18 et 22°C n'ont aucune influence sur la différenciation sexuelle et la sex-ratio reste bien équilibré. Cependant des températures extrêmes peuvent perturber la différenciation de l'un des deux sexes.

Chez *Pleurodeles waltl*, l'élevage des larves à la température de 30 à 32°C entraîne une modification du sexe ratio en faveur du sexe mâle (Dournon *et al.*, 1984a). Ces températures élevées provoquent en outre une réduction de la longueur totale des larves et une accélération du développement larvaire (Dournon & Houillon, 1985). À 30°C un traitement commencé au stade 43 doit être poursuivi jusqu'à la métamorphose (stade 56) pour être efficace (70% d'inversion sexuelle) alors qu'à 31 ou 32°C, le traitement est totalement efficace lorsqu'il est appliqué du stade 43 au stade 54. Cependant un traitement à 32°C est sans effet s'il est interrompu au stade 50, même lorsqu'il est commencé tôt (stade 40).

Les conditions optimales permettant d'obtenir une inversion de la totalité des femelles génétiques ZW ont été définies: celle-ci est obtenue lors d'un élevage à 32°C du stade 42 au stade 54. Cette période, thermosensible, est une période critique du développement larvaire car elle précède les premières étapes de la différenciation histologique des gonades (Figure 14).

Les thermo-néo-mâles ZW³² obtenus sont fertiles et leur croisement avec des femelles standard ZW permet d'obtenir 25% de femelles WW.

Le mode d'action de la température sur le développement des gonades n'est pas encore bien compris, mais il a été suggéré que les températures élevées pourraient agir sur la régulation de certains facteurs impliqués dans la différenciation sexuelle comme l'aromatase. En effet, l'activité aromatase chez des larves ZW³² pendant toute la période thermosensible est similaire à celle observée chez les individus mâles ZZ (Chardard *et al.*, 1995) (voir partie I.4.2.2).

I.4.2. Influence des hormones stéroïdes sexuelles

Les effets des hormones stéroïdes sexuelles sur la différenciation des gonades ont été largement relatés. Ces hormones peuvent influencer la différenciation sexuelle et altérer la sex-ratio. Elles peuvent aussi provoquer des anomalies gonadiques ou même de l'inversion partielle ou complète du sexe. Le rôle des stéroïdes sexuels a été d'abord examiné chez *Rana esculenta*. Chez plusieurs amphibiens, le sexe a été inversé lorsque les stéroïdes ont été ajoutés dans l'eau d'élevage ou injectés directement aux larves. En effet, le traitement avec des œstrogènes pendant la vie larvaire conduit à une inversion des mâles en femelles chez l'anoure *Xenopus laevis* et chez les urodèles *Ambystoma punctatum*, *Hynobius retardatus* et *Triturus helveticus* (Hayes, 1998).

De nombreux stéroïdes comme les progestatifs, les corticoïdes et les androgènes, ont des effets similaires sur l'inversion sexuelle. Tous ces stéroïdes sont capables d'induire le développement testiculaire en produisant une descendance unisexuée mâle. L'effet d'une hormone sexuelle peut varier selon les espèces (œstrogènes produisent que des femelles ou que des mâles), ou selon les doses utilisées chez la même espèce (des doses faibles d'E₂ induisent 100% des femelles, alors que les fortes doses donnent 100% de mâles), ou bien selon les stades du développement auxquels les hormones ont été administrées (application d'E₂ au début de la différenciation testiculaire conduit à une différenciation ovarienne, cependant le traitement fait plus tard au cours de la différenciation du testicule n'a aucun effet ni sur la différenciation gonadique ni sur la sex-ratio).

Chez les vertébrés, le rôle des stéroïdes sexuels dans la détermination et la différenciation sexuelle a été largement étudié (Nakamura *et al.*, 1998; Baroiller *et al.*, 1999; Guiguen *et al.*, 1999, 2010; Devlin & Nagahama, 2002; Strüssmann & Nakamura, 2002; Nakamura, 2010). Chez les vertébrés non mammaliens, les traitements avec des œstrogènes ou des androgènes

modifient ou inversent la différenciation gonadique, alors que chez les mammifères la différenciation des gonades a lieu indépendamment de ces hormones.

Les hormones stéroïdes sont synthétisées à partir du cholestérol à l'issue de plusieurs réactions enzymatiques. L'étape clé et limitante de la biosynthèse des stéroïdes sexuels est la coupure de la chaîne latérale du cholestérol, par le cytochrome P450_{scc} (*side chain clivage*), qui conduit à la formation de la prégnénolone. Les androgènes et les œstrogènes sont les derniers éléments de la synthèse stéroïdienne et la balance entre eux est régulée par différentes enzymes. La testostérone peut être convertie soit en œstradiol par l'aromatase soit en DHT non aromatisable par la 5 α -réductase (Miller, 1988). Les œstrogènes sont produits dans les cellules des follicules ovariens, tandis que les androgènes sont synthétisés dans les cellules de Leydig.

I.4.2.1. Stéroïdes et différenciation sexuelle

Pour illustrer le rôle des hormones stéroïdes dans la différenciation des gonades, il faut analyser leur production avant, pendant et après la différenciation du sexe. De cette façon, nous saurons si la différenciation gonadique est régulée par les stéroïdes sexuels, ou l'inverse, la production de ces derniers est le résultat de la différenciation sexuelle des gonades. Chez *Rana rugosa*, les gènes de la stéroïdogénèse semblent être exprimés dans les gonades indifférenciées des deux sexes dès les stades qui précèdent la différenciation du sexe (Maruo *et al.*, 2008). Par exemple, des enzymes importantes de la chaîne de biosynthèse des hormones stéroïdes, telles que 3 et 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β HSD et 17 β HSD), sont présentes et actives dans les gonades indifférenciées. Par ailleurs, les gonades indifférenciées des femelles peuvent convertir la progestérone en androstènedione (précurseur des androgènes) plus efficacement que des larves mâles (Sakurai *et al.*, 2008). De plus, l'expression de *cyp19* (gène de l'aromatase) est significativement plus élevée dans la gonade indifférenciée des femelles (Maruo *et al.*, 2008), alors que *cyp17*, une autre enzyme importante dans la stéroïdogénèse, est exprimée fortement dans les gonades indifférenciées des mâles. Son expression devient beaucoup plus forte dans les ovaires de *R. rugosa*, après une inversion sexuelle effectuée par une injection de testostérone chez des larves femelles (Iwade *et al.*, 2008). Ceci suggère que *cyp19* (Cytochrome P450 19) joue un rôle important dans la différenciation femelle, alors que *cyp17* est nécessaire pour la différenciation mâle. Les stéroïdes pourraient donc être le facteur clé pour la différenciation sexuelle chez l'amphibien *R. rugosa* (Nakamura, 2009, 2013).

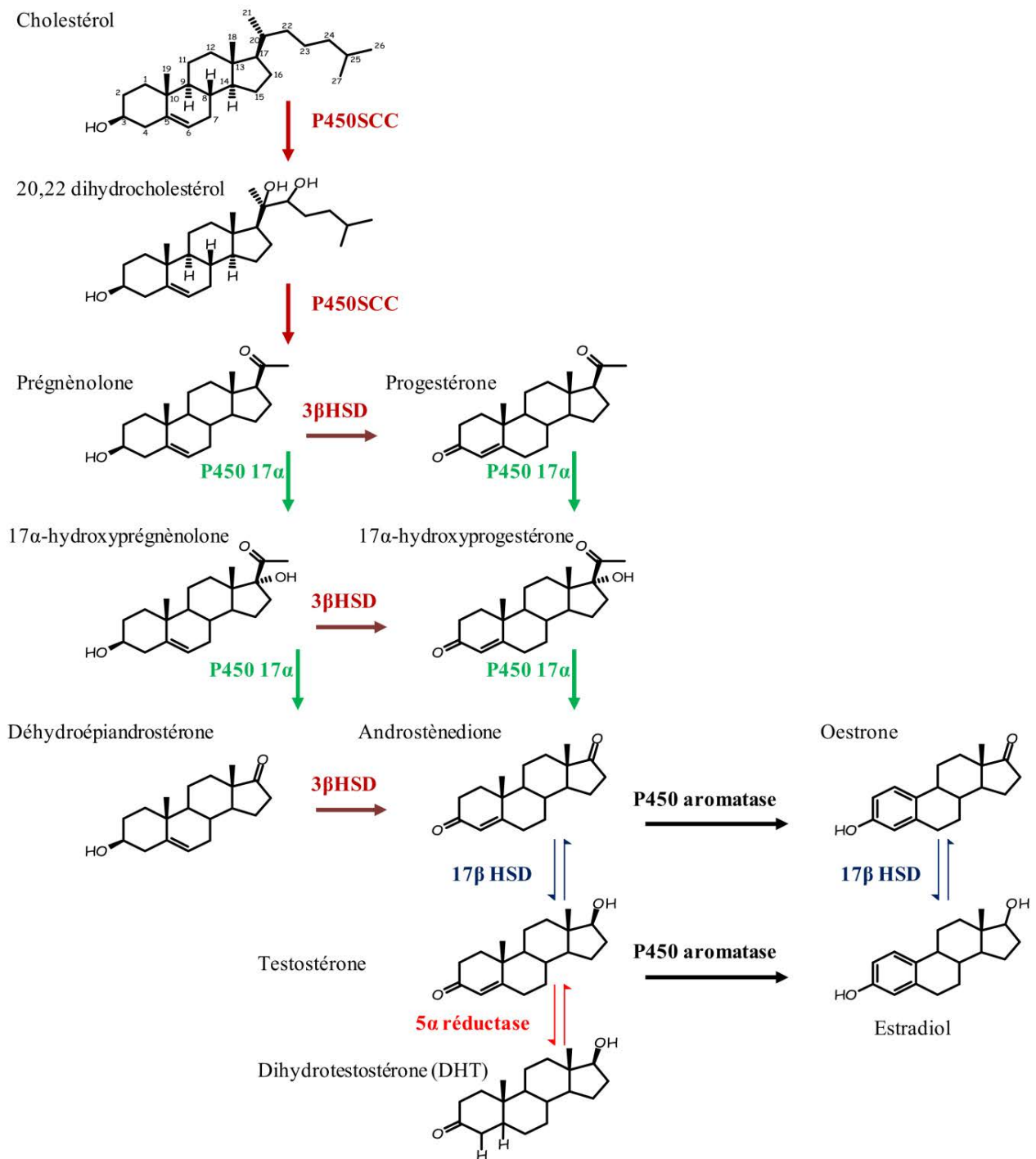


Figure 15 : Etapes principales de la stéroïdogénèse chez les vertébrés.

Chez le pleurodèle, l'effet des hormones stéroïdes a été bien étudié. Elles ont une action plus tardive par rapport à la température: la période hormonosensible s'étend du stade 52 au stade 56 (Figure 14A). L'utilisation de stéroïdes chez le pleurodèle a montré que la production d'E₂ est importante pour la différenciation femelle. En effet, le traitement des larves à l'E₂ (100µg/L) conduit à une différenciation des individus génétiquement mâles (ZZ) en néo-femelles fertiles (ZZ^{E2}) (Gallien, 1951; Chardard *et al.*, 2003; Kuntz *et al.*, 2003a).

Le traitement par la testostérone a été aussi étudié chez le pleurodèle. La testostérone a un effet paradoxal car elle n'affecte pas les larves femelles mais elle provoque l'inversion sexuelle des mâles en femelles (Gallien, 1962). Cet effet paradoxal est expliqué par l'aromatisation de la testostérone en œstradiol. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation d'androgènes non aromatisables. Par exemple, lorsqu'il est appliqué à 500 µg/l sur des larves ZZ pendant la période thermosensible, la DHT, un androgène qui provient de la conversion de la testostérone par la 5α-réductase, n'inverse pas les mâles ZZ alors qu'elle induit la masculinisation des larves génétiquement femelles ZW (Chardard *et al.*, 2003). De plus, l'exposition de larves ZW à 400 µg/L de 11β hydroxyandrostendione (11β-OHA) conduit à un effet masculinisant plus important que la DHT.

Chez le pleurodèle, la 3βHSD a été étudiée. L'analyse histochimique a révélé la présence de la 3βHSD dans les gonades indifférenciées des deux sexes dès le stade 44 (Collenot & Collenot, 1977). Cette enzyme est active dans les gonades de larves ZZ et ZW avant le début de la différenciation sexuelle, ce qui suggère que la synthèse d'hormones stéroïdes a déjà commencé dans la gonade histologiquement indifférenciée. *CYP19* a aussi été bien étudié chez le pleurodèle (voir partie aromatisation). Les effets de tous les traitements effectués visant à inverser le sexe des larves de pleurodèle sont résumés dans la figure 14B.

I.4.2.2. Aromatase et différenciation sexuelle

L'aromatase est un complexe enzymatique appartenant à la superfamille des cytochromes P450, qui est localisé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Cette enzyme est codée par un gène unique (*CYP19*) capable de convertir les androgènes en œstrogènes et impliqué également dans la différenciation ovarienne chez le pleurodèle. Les principales étapes de la stéroïdogénèse chez les vertébrés sont présentées dans la Figure 15.

I.4.2.2.1. Aromatase et différenciation femelle

Les mesures de l'activité aromatase ont montré des différences selon le devenir sexuel des gonades. En effet, l'activité de l'aromatase est faible et constante au stade 47 dans les gonades des deux sexes, puis elle augmente significativement chez les larves ZW au stade 52 avant la différenciation histologique des gonades. Cette différence entre ZZ et ZW s'accroît par la suite : au stade 54, l'activité de l'aromatase devient 40 fois plus élevée chez les femelles que chez les mâles (Chardard *et al.*, 1995). Ceci suggère que l'aromatase joue un rôle clé dans la différenciation femelle et que la différence d'activité entre les deux sexes au stade 52 pourrait être le premier signe de cette différenciation, avant tout signe histologique.

L'activité de l'aromatase a également été mesurée chez des mâles ZZ traités avec de l'E₂. Ce traitement conduit à une augmentation de l'activité aromatase en corrélation avec la différenciation femelle. En revanche, l'exposition de larves ZW à un inhibiteur d'aromatase (le fadrozole) conduit à une diminution de l'activité enzymatique en corrélation avec l'apparition d'un développement mâle (Chardard & Dournon, 1999).

I.4.2.2.2. Aromatase et effet de la température

Il a été suggéré que la production d'œstrogènes pouvait être perturbée lors du traitement thermique, puisque d'une part la température inverse les femelles génétiques ZW en néo-mâles fertiles (Dournon *et al.*, 1984a), et d'autre part les œstrogènes sont capables de contrecarrer l'effet masculinisant de la température (Zaborski, 1986). L'aromatase semble être impliquée dans l'action de la température puisque l'élevage de larves ZW à 32°C pendant la période thermosensible conduit à une absence d'augmentation de l'activité aromatase qui reste au niveau de celle des larves ZZ (Chardard *et al.*, 1995). Cependant, la température n'inhibe pas l'activité de l'enzyme puisque les dosages se font à 37°C. L'expression de l'aromatase pourrait être affectée par un élevage à 32°C des larves ZW car les taux d'ARN messager (ARNm) mesurés par RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) semi-quantitative ou PCR en temps-réel se révèlent être inférieurs à ceux mesurés chez les larves ZW²⁰ (Kuntz *et al.*, 2003b; Ko *et al.*, 2008).

I.4.2.3. SF1 (Steroidogenic Factor 1)

Le gène *Sf1* code un récepteur nucléaire orphelin. Chez diverses espèces, SF1 est exprimé dans plusieurs tissus impliqués dans la stéroïdogénèse et/ou la reproduction, tels que les

glandes surrénales chez les mammifères et les organes correspondants chez les autres espèces, comme le tissu interrénal chez les amphibiens (Mayer *et al.*, 2002).

Chez les vertébrés, il joue un rôle important dans la mise en place de la gonade ainsi que dans sa différenciation. Son invalidation chez la souris conduit à une agénésie gonadique et surrénalienne (Luo *et al.*, 1994; Sadovsky *et al.*, 1995). Ainsi, il a été montré que le développement gonadique et surrénal est initié et la migration des CG se fait correctement en l'absence de *Sf1*. Cependant, par la suite, les gonades régressent à un stade précis du développement par apoptose. Comme cette régression a eu lieu avant la différenciation testiculaire normalement, les canaux de Müller persistent chez ces souris knock-out du façon indépendant de leur sexe génétique (Parker *et al.*, 2002).

Les transcrits *Sf1* sont détectés très tôt lors du développement dans les crêtes génitales mâles et femelles chez de nombreuses espèces (Ikeda *et al.*, 1994; Hatano *et al.*, 1994; Hanley *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999; Kawano *et al.*, 1998). Ensuite, au cours du développement gonadique, une expression sexuelle dimorphique de *Sf1* augmente dans un sexe qui varie selon les espèces. En effet, *Sf1* est exprimé davantage dans les gonades femelles suggérant son implication dans la différenciation ovarienne chez le poulet, l'alligator et la grenouille *Rana catesbeiana* (Smith *et al.*, 1999; Western *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2002) tandis qu'il interviendrait plutôt dans la différenciation testiculaire chez les mammifères et la tortue (Ikeda *et al.*, 1994; Wibbels *et al.*, 1998; Fleming *et al.*, 1999).

Chez *Pleurodeles waltl*, *sf1* est aussi exprimé très tôt, dès le stade 42, où la gonade est indifférenciée, chez les larves ZZ²⁰ et ZW²⁰. Cette expression devient significativement plus importante chez les larves ZW²⁰ que chez les larves ZZ²⁰ et ZW³² au stade 55 que l'analyse soit réalisée sur les complexes GM ou sur les gonades seules suggérant une implication dans la différenciation ovarienne (Kuntz *et al.*, 2006). L'expression de SF1, est-elle contrôlée par la température ou par les œstrogènes ? Pour répondre à cette question, Kuntz *et al.*, en 2006 ont réalisé un choc thermique de 48h appliqué à la fin de la période thermosensible (stade 54), et n'ont pas observé de modification du taux de transcrits. Ceci suggère que la température n'a pas d'effet inhibiteur direct sur l'expression de *Sf1*. Ces auteurs ont aussi fait un traitement thermique au cours de la période thermosensible pour induire une inversion du sexe. Les résultats ont montré une diminution (3,7 fois) de l'expression de *Sf1* dans les gonades de larves ZW³² par rapport aux témoins ZW²⁰, mais elle n'apparaît que tardivement, au stade 55. Ces auteurs ont conclu que la diminution de l'expression de *sf1* au stade 55 chez les larves ZW³² est la conséquence de la différenciation testiculaire et de la baisse de synthèse

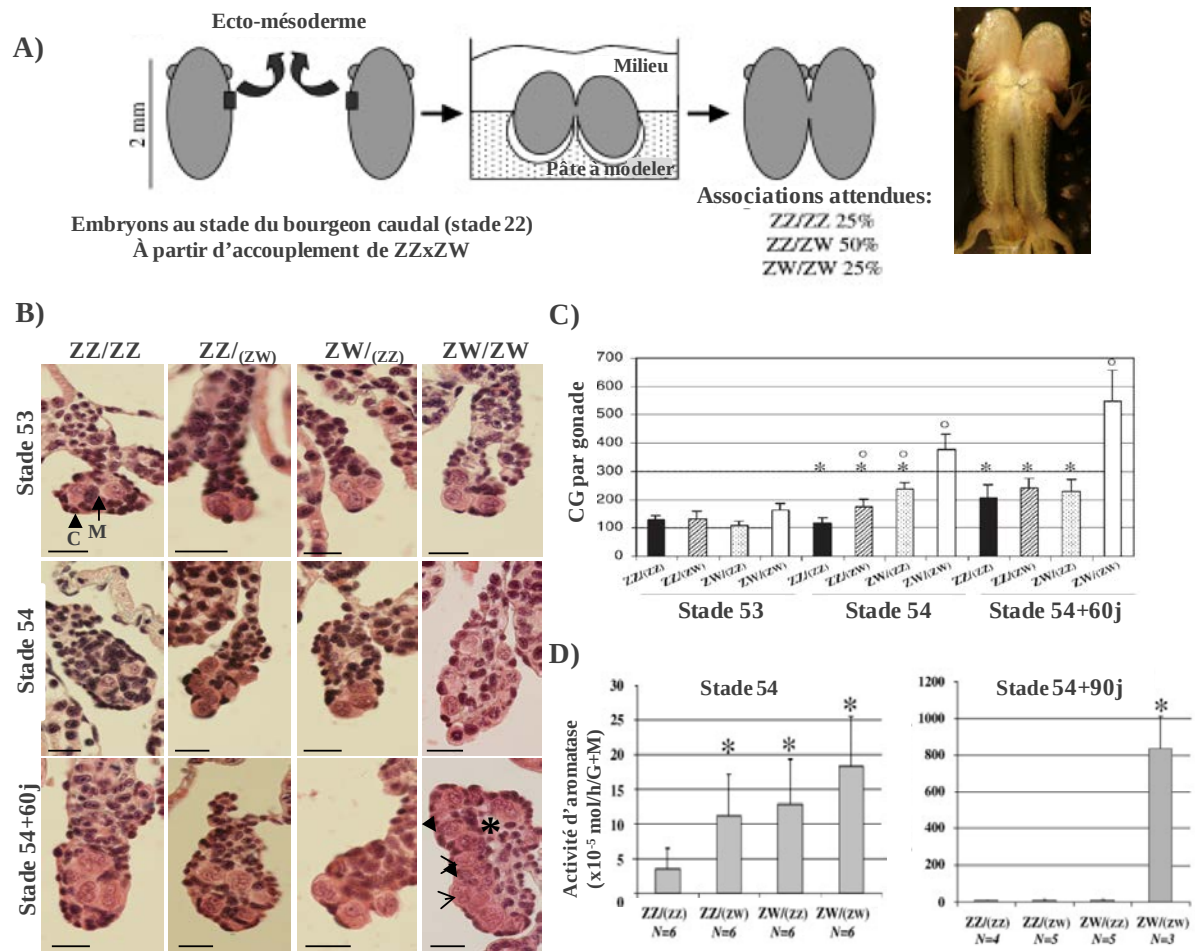


Figure 16 : Parabioses embryonnaires chez le pleurodèle. **A)** Protocole simplifié de réalisation des parabioses. **B)** L'histologie des gonades chez les parabioses des stades 53 à 54+60j. Chez les ZZ/ZZ, la différenciation testiculaire est reconnue par la localisation des CG dans la médulla (M) dès le stade 53. Chez les ZZ/ZW, la gonade ZZ se différencie comme un testicule mais la localisation médullaire des CG apparaît plus tard au stade 54+60j. La gonade ZW est anormale : au stade 54+60j, pas de cavité centrale, les CG se localisent dans le cortex mais leur nombre n'est pas aussi élevé que dans les ovaires typiques et elles ne sont pas entrées en méiose. Chez les ZW/ZW, l'ovaire différencié est caractérisé par des CG situées dans le cortex (C) et la dégénérescence médullaire laisse une cavité centrale (*) clairement observée au stade 54+60j. A ce stade, les CG commencent à proliférer. (>) : une CG avec un noyau polylobé. (►) : une CG en méiose. Barres = 25 µm. **C)** Nombre de CG dans les gonades ZZ ou ZW des parabioses du pleurodèle aux stades 53, 54 et 54+60j. (*) : significativement différent des ZW/ZW ($P < 0,05$). (°) : significativement différent des ZZ/ZZ ($P < 0,05$). **D)** Activité aromatase aux stades 54 et 54+90j chez les parabioses. (*) : significativement différent des ZZ/ZZ ($P < 0,05$) (d'après Dumond *et al.*, 2008b).

d'œstrogènes. Cette dernière est expliquée par la diminution de l'activité et l'expression de l'aromatase sous l'effet du traitement thermique (Chardard *et al.*, 1995; Kuntz *et al.*, 2003a; b) (voir partie aromatase). En effet, un traitement par l'E₂ pendant 48h au stade 55 a été réalisé afin de savoir l'effet des œstrogènes sur l'expression de *sf1*. Les résultats ont indiqué une augmentation significative de l'expression de *sf1* (2,4 fois) chez les larves ZZ^{E2} versus ZZ²⁰. Cette augmentation a été corrélée avec une expression plus élevée de l'aromatase dans les gonades des larves ZZ^{E2}. L'ensemble de ces résultats indiquent que la transcription de *sf1* est régulée positivement par les œstrogènes plutôt que par la température chez le pleurodèle (Kuntz *et al.*, 2006).

I.4.3. Parabiose

C'est une méthode de l'embryologie expérimentale par laquelle deux embryons sont associés chirurgicalement, et se développent alors ensemble avec une connexion entre leurs circulations sanguines. Cela s'effectue au stade du bourgeon caudal (stade 22). Les associations peuvent être de même sexe génétique ZZ/ZZ, ZW/ZW ou de sexe génétique différent ZZ/ZW. Ces embryons peuvent se développer jusqu'à l'âge adulte un peu comme des siamois (Figure 16). Chez le pleurodèle, lors d'associations ZZ/ZW, la gonade ZZ se différencie en testicule normal, alors que le développement de la gonade ZW est altéré. En effet, au stade 54+60j, chez le parabionte ZW la cavité ovarienne centrale n'existe pas, les CG sont dans une position corticale, leur nombre n'est pas aussi élevé que dans un ovaire typique, et elles ne sont pas entrées en méiose. L'activité et l'expression de l'aromatase et de *sf1* sont aussi réduites (Figure 16) (Dumond *et al.*, 2008a). A l'âge adulte, ces gonades ZW restent vestigiales et ne possèdent plus de CG. Leur compartiment somatique ne semble pas masculinisé puisque le marqueur testiculaire DMRT1 ne s'exprime pas dans ces gonades. La différenciation ovarienne du pleurodèle est donc inhibée par la présence d'un environnement hormonal mâle (Dumond *et al.*, 2008b).

Les parabioses chez le pleurodèle montrent que des hormones mâles peuvent empêcher le développement ovarien. Il est intéressant de comparer ce résultat avec ceux des traitements par les androgènes. En effet, les traitements par des androgènes non aromatisables induisent des inversions sexuelles fonctionnelles. Les androgènes ne peuvent donc pas être à l'origine de l'inhibition du développement ovarien observé chez les parabioses ZZ/ZW. Par contre, ce type de parabiose semble reproduire l'effet free-martin, observé naturellement chez les bovidés lors de grossesses avec faux-jumeaux, laissant penser à la production de l'hormone

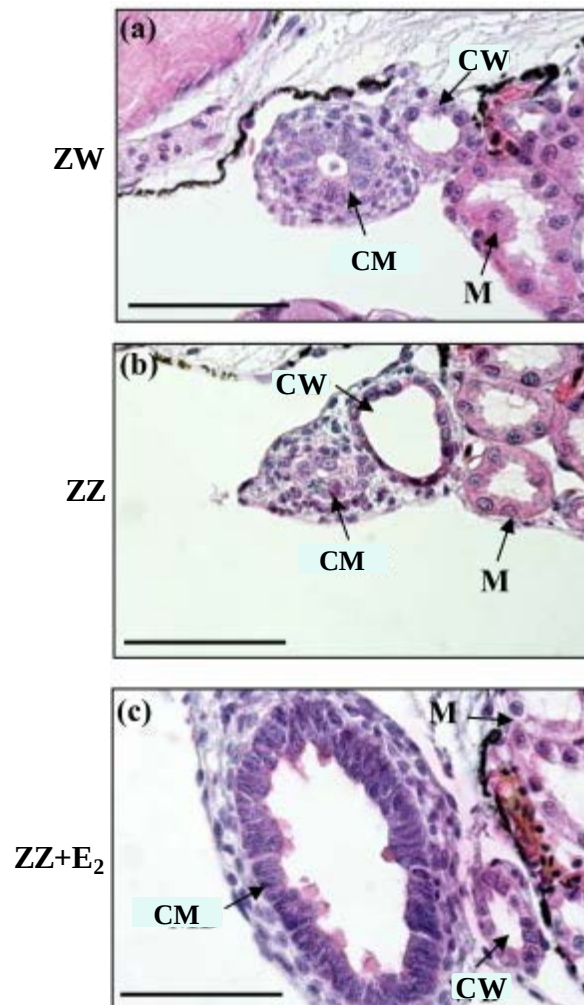


Figure 17 : Coupes histologiques du tractus urogénital chez le pleurodèle. Au stade 56, les mâles (ZZ) et les femelles (ZW) possèdent à la fois les canaux de Wolff et de Müller situés à la proximité du mésonéphros (M). Les canaux de Wolff (CW) sont requis pour l'élimination de l'urine chez les deux sexes, mais ils sont également utilisés pour le transport des spermatozoïdes chez les mâles. Les canaux de Müller (CM) se différencient en oviductes chez les femelles, tandis que chez les mâles, ils seront maintenus sans différenciation. Cependant, ils ont la capacité de se différencier en oviductes chez les mâles lors d'une stimulation par l'œstradiol (E₂). Barres = 100 µm, toutes les images ont été obtenues au même grossissement (d'après Flament *et al.*, 2011).

anti müllerienne (AMH) par la gonade mâle. A ce jour, la présence de l'AMH n'a pas été décrite chez les amphibiens.

I.5. Différenciation du tractus génital

Chez les embryons de vertébrés, à l'exception des poissons, un double système de voies génitales est mis en place: canal de Müller susceptible d'évoluer en oviducte et canal de Wolff susceptible d'évoluer en spermiducte. Ils sont localisés au niveau du mésonéphros. Au début du développement, les deux canaux sont similaires chez les individus mâles et femelles. Selon le sexe de la gonade qui se différenciera, un seul des deux systèmes subsistera (Josso, 1970; Thibault *et al.*, 1993). Les hormones produites par la gonade vont diriger la différenciation du tractus. L'AMH sécrétée par les cellules de Sertoli entraîne la régression des canaux de Müller chez les individus mâles, et la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig assure le développement des tractus génitaux mâles à partir des canaux de Wolff en donnant l'épididyme, vésicules séminales et canaux déférents. Chez les individus femelles, en absence d'AMH les canaux de Müller persistent tandis que l'absence de testostérone ne permet pas le maintien des canaux de Wolff (Thibault *et al.*, 1993; Greenstein, 1995) (voire la partie AMH).

Il en va de même chez les amphibiens anoures. Une exception concerne le canal de Wolff qui sera maintenu chez les femelles puisqu'il sert aussi d'uroducte dans la mesure où contrairement aux amniotes, il n'y a pas de métanéphros ni d'uretère secondaire.

Cependant, une différence majeure existe chez les urodèles comme le pleurodèle : chez les larves ZZ, les canaux de Wolff se différencient en uro-spermiductes, par contre, les canaux de Müller seront maintenus sans se différencier (Figure 17). La persistance des canaux de Müller chez les mâles peut être démontrée facilement par un traitement à l'œstradiol : il déclenche la différenciation des oviductes, même si le traitement a été effectué à l'âge adulte.

Enfin, il est à noter qu'à l'heure actuelle, aucune étude sur les gènes impliqués dans le développement testiculaire n'a été menée chez le pleurodèle. Dans la suite de cette introduction, nous présenterons les deux gènes associés au processus de différenciation mâle, notamment *sox9* et *amh*. Ensuite, nous aborderons l'importance des CG au cours de la différenciation gonadique.

II) Les facteurs SOX

II.1) Généralités: Structure moléculaire et Fonction

La famille SOX, acronyme de (*Sry-related HMG box*), est une famille de facteurs de transcription qui sont des acteurs majeurs du développement chez les vertébrés. Ils contrôlent durant l'embryogenèse de nombreuses étapes de déterminisme, de prolifération et de différenciation cellulaire dans divers tissus (Pevny & Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999; Guth & Wegner, 2008). Ils sont impliqués dans le développement du système nerveux, la morphogenèse osseuse, la formation des cellules pigmentaires, le développement du système immunitaire et notamment le déterminisme sexuel mâle, rôle principal de *Sry* ; gène identifié en 1990 chez la souris et l'homme comme étant le premier membre de la famille (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990).

Les gènes *Sox* sont connus uniquement dans le règne animal (Bowles *et al.*, 2000). Vingt membres ont été identifiés chez l'homme et la souris. Ils sont classés en 8 groupes, du groupe A à H avec deux sous-groupes B ; B1 et B2, en fonction de leur homologie de séquence et de leur structure exon-intron (Bowles *et al.*, 2000; Schepers *et al.*, 2002; Lefebvre *et al.*, 2007; Guth & Wegner, 2008). Des gènes orthologues de *Sox* ont été identifiés chez d'autres vertébrés et chez les invertébrés, incluant divers marsupiaux, reptiles, amphibiens, la drosophile et le nématode. Ces orthologues correspondent le plus souvent à l'un des gènes identifiés chez les mammifères, cependant deux gènes *Sox*, identifiés chez le xénope et le nématode ne semblent pouvoir être associés à aucun groupe et ont donc été placés dans les groupes I et J, respectivement (Bowles *et al.*, 2000). Chez les vertébrés, chaque groupe contient un ou plusieurs membres, alors qu'un seul membre représente son groupe chez les invertébrés, ce qui suggère qu'une duplication des gènes s'est faite au cours de l'évolution des vertébrés (Bowles *et al.*, 2000; Koopman *et al.*, 2004). La plupart des gènes *Sox* consistent un à trois exons et codent une seule protéine. Les gènes *SoxD* et *SoxH* possèdent plusieurs exons et, par conséquent, codent plusieurs protéines (Hiraoka *et al.*, 1998; Osaki *et al.*, 1999; Lefebvre *et al.*, 2007).

Les protéines SOX se lient à l'acide désoxyribonucléique (ADN) grâce à leur domaine de liaison, la boîte HMG (*High Mobility Group*), qui leur confère leur fonction de facteur de transcription (Gubbay *et al.*, 1990). La superfamille des protéines à domaine HMG se divise en deux grandes familles : (i) la famille TCF/SOX/MATA, composée de protéines qui ne possèdent qu'un seul domaine HMG, a un profil d'expression restreint et se lient à l'ADN en reconnaissant une séquence spécifique. (ii) la famille HMG/UBF, dont les protéines possèdent

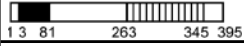
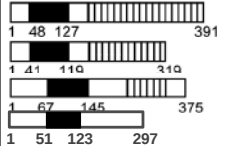
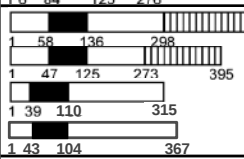
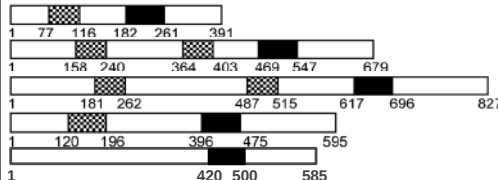
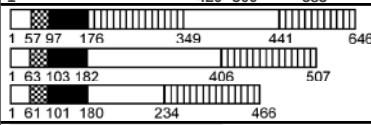
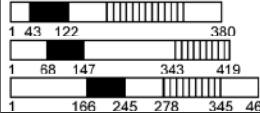
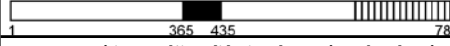
Groupe	Gène	Structure protéique	Fonction
A	<i>Sry</i>		Gène responsable de la détermination testiculaire chez les mammifères.
B1	<i>Sox1</i> <i>Sox2</i> <i>Sox3</i> <i>Sox19</i>		Gènes exprimés pendant le développement précoce du système nerveux central (CNS). <i>Sox1</i> , <i>Sox2</i> et <i>Sox3</i> s'expriment chez la souris, alors que <i>sox19</i> s'exprime chez le poisson-zèbre.
B2	<i>SOX14</i> <i>SOX21</i>		Gènes impliqués dans la segmentation embryonnaire, le développement du cerveau et la différenciation de l'intestin chez le poulet.
C	<i>Sox4</i> <i>Sox11</i> <i>SOX22</i> <i>sox24</i>		Chez la souris, <i>Sox4</i> joue un rôle dans le développement cardiaque et le développement des cellules B. <i>Sox11</i> s'exprime dans les neurones matures du CNS. Chez l'homme, <i>SOX22</i> est exprimé dans le CNS alors que <i>sox24</i> s'exprime dans les ovocytes de truite.
D	<i>Sox5</i> <i>Sox5L</i> <i>Sox6</i> <i>Sox13</i> <i>sox23</i>		Chez la souris, <i>Sox5</i> et <i>Sox6</i> sont exprimés au cours de la spermatogenèse et la chondrogenèse. Leur implication dans la chondrogenèse est soutenue par l'interaction avec <i>SOX9</i> . <i>Sox6</i> peut agir de manière redondante avec <i>SOX5</i> . <i>Sox13</i> s'exprime durant le développement des artères et dans le thymus de souris, alors que <i>sox23</i> s'exprime dans les ovaires et le cerveau des embryons de truite.
E	<i>Sox8</i> <i>Sox9</i> <i>Sox10</i>		<i>Sox8</i> s'exprime dans le cerveau, le cœur et les testicules. <i>Sox9</i> est un régulateur clé de la chondrogenèse et la détermination du sexe. La mutation de ce gène chez l'homme conduit au syndrome de dysplasie campomélique. Les cellules dépourvues de <i>SOX9</i> ne peuvent pas se différencier en chondrocytes. <i>Sox10</i> , quant à lui, est un régulateur de la différenciation des cellules de la crête neurale.
F	<i>Sox7</i> <i>Sox17</i> <i>Sox18</i>		<i>Sox17</i> est un régulateur du développement endodermique et de la spermatogenèse, alors que <i>Sox18</i> est un régulateur du développement des vaisseaux sanguins ainsi que du développement des follicules pileux.
G	<i>Sox15</i>		Chez la souris, <i>Sox15</i> est un inhibiteur de la différenciation des myoblastes.
H	<i>Sox30</i>		Gène humain exprimé dans les CG des testicules embryonnaires.
I	<i>sox31</i>	Les expériences d'invalidation de ce gène chez le xénope démontrent un rôle dans l'induction neurale.	
J	<i>SoxJ</i>	Un gène chez <i>C. elegans</i> représentant une protéine SOX qui est totalement distincte de toutes les protéines SOX à boîte HMG.	

Tableau 1 : Classification des gènes Sox, organisation structurelle protéique et fonction au cours du développement chez différents vertébrés. Les protéines SOX sont schématisées comme des boîtes, avec les positions du premier et du dernier acide aminé et les limites des domaines fonctionnels. Ces domaines sont le domaine HMG (noir), les domaines de transactivation (bandes verticales), le domaine de transrépression (bandes horizontales) et le domaine de dimérisation (damier) (d'après Bowles *et al.*, 2000; Lefebvre *et al.*, 2007).

plusieurs domaines HMG, ont une expression ubiquitaire et sont moins spécifiques dans leur liaison à l'ADN. Peu d'acides aminés (aa) sont conservés entre les boîtes HMG des membres de la superfamille à domaine HMG. En revanche, dans chaque sous-famille il existe une forte conservation du domaine HMG (Laudet *et al.*, 1993; Grosschedl *et al.*, 1994; Soullier *et al.*, 1999). Ce domaine HMG, composé de 79 aa, présente plus de 50% d'homologie avec le domaine HMG du facteur SRY (Kamachi *et al.*, 2000). Il est hautement conservé parmi les facteurs Sox et reconnaît un motif consensus commun 5'-(A/T) (A/T) CAA (A/T) G-3' (Giese *et al.*, 1994; Harley & Goodfellow, 1994; Harley *et al.*, 1994; Collignon *et al.*, 1996; Wegner, 2010). Le domaine HMG est capable de faire plusieurs fonctions tels que la liaison à l'ADN, les interactions protéine-protéine et l'importation/exportation nucléaire (Lefebvre *et al.*, 2007). D'ailleurs, la plupart des protéines SOX présentent, en plus de la boîte HMG, un ou plusieurs domaines fonctionnels, tels que les domaines de trans-activation/répression ainsi des domaines de dimérisation. Ces domaines sont généralement très conservés entre les orthologues ainsi que les membres de même groupe, alors qu'ils sont complètement différents entre les différents groupes (Lefebvre *et al.*, 2007; Wegner, 2010). D'une façon générale, la plupart des facteurs Sox possèdent un domaine de transactivation à leur extrémité carboxy-terminale et donc agissent comme activateurs de la transcription. Les SOX du même groupe présentent une identité très élevée d'aa (70-95%). En revanche, celles de différents groupes partagent peu de similarité en dehors de leur domaine HMG (Wegner, 1999). La structure moléculaire des différents membres des facteurs Sox ainsi leurs domaines et leurs fonctions sont présentés dans le tableau 1.

Les mécanismes d'action de facteurs Sox varient selon les types cellulaires. En général, les gènes Sox régulent la spécification et la différenciation de nombreux types cellulaires. Ainsi, les gènes d'un même groupe ont souvent des rôles fonctionnels similaires. Ils peuvent également partager la fonction des gènes d'un autre groupe. Le même gène peut s'exprimer pendant différents stades du développement dans un ou plusieurs types cellulaires.

Il est intéressant à noter que les protéines SOX forment des complexes multiprotéiques au niveau des séquences promotrices ou activatrices de leur gène cible, qui déterminent la spécificité de chaque gène Sox (Wilson & Koopman, 2002). Les protéines SOX sont capables d'interagir avec des partenaires de différentes natures, telles que d'autres facteurs de transcription, des protéines adaptatrices, telles que les protéines PDZ par exemple ou encore des protéines de transport nucléaire (Poulat *et al.*, 1997; Wilson & Koopman, 2002), (Tableau 2, Figure 18). Ces partenariats conduisent à l'élaboration de complexes multiprotéiques plus

Protéines SOX	Protéines partenaires	Site nécessaire pour l'interaction	Gènes régulés	Type cellulaire / Tissu
SOX2	OCT3/4	Domaine HMG	<i>Fgf4, hoxb1, ostéopontine</i>	Cerveau antérieur
SOX2	PAX6	Domaine HMG	<i>δ-crystalline</i>	Christallin
SOX4	Synténine (Protéine PDZ)	ND	ND	Cellules B
SOX9	SF1	Domaine HMG	<i>Amh</i>	Cellules de Sertoli
SOX9	HSP70	Résidus 236-330	NV	Multiple
SRY	Récepteur d'androgène	Domaine HMG	ND	Cellules de Sertoli / Canaux de Wolff
SRY	Importine β	Domaine HMG et cNLS	NV	Cellules de Sertoli
SRY	Calmoduline	Domaine HMG	ND	ND

NV: Non Valable ND: Non Déterminé

Tableau 2 : Les protéines SOX et leurs partenaires. (d'après Wilson & Koopman, 2002).

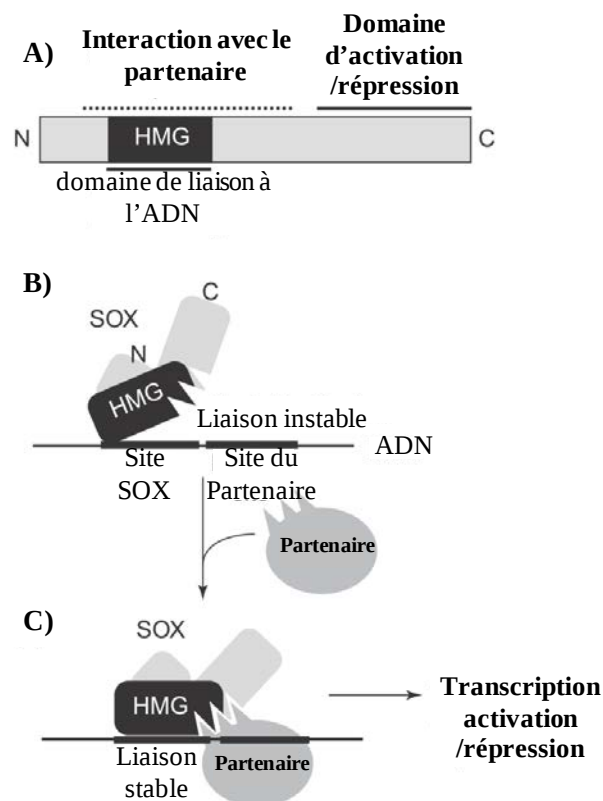


Figure 18 : Modèle d'interactions entre SOX et ses partenaires. **A)** La protéine SOX comprend trois domaines fonctionnels : un domaine HMG pour interagir avec l'ADN, un domaine d'activation ou répression généralement localisé à proximité de l'extrémité C-terminale, et une région qui peut inclure une partie du domaine HMG afin d'interagir avec le partenaire. **B)** Dans ce modèle, quand une protéine SOX se lie à un site SOX seulement par son domaine HMG, la liaison est probablement instable. **C)** Lorsque le partenaire interagit avec SOX et se lie au site de l'ADN à côté du site SOX, la protéine SOX sera stabilisée sur l'ADN et présente alors son activité d'activation/répression de la transcription (d'après Kamachi *et al.*, 2000).

stables, transcriptionnellement actifs et spécifiques de certains gènes cibles (Kamachi *et al.*, 2000). Ainsi, un même gène cible pourra, selon la présence de différentes protéines partenaires être activé ou réprimé (Wilson & Koopman, 2002).

Dans ce manuscrit nous nous sommes intéressés au gène *Sox9*, appartenant au groupe SoxE, comme un marqueur de la différenciation testiculaire au cours du développement gonadique chez les vertébrés.

II.2. Le gène *Sox9* (*Sry-related HMG box 9*)

II.2.1. Généralités

Appartenant à la sous famille Sox-E, *Sox9* est un facteur de transcription impliqué dans la formation osseuse et le contrôle du développement testiculaire (Pritchett *et al.*, 2011). Chez l'homme, des translocations ou des mutations affectant ce gène conduisent au syndrome de la dysplasie campomélique (CD) (OMIM 114290). C'est un trouble létal atteignant 1 enfant sur 100.000, dû à une haplo-insuffisance du gène *SOX9* (17q24.3-q25.1) pendant l'embryogenèse, caractérisé par de sévères malformations squelettiques associées à des inversions sexuelles chez certains individus de génotype XY (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Gordon *et al.*, 2009). Il existe aussi des troubles du développement des reins, du cœur, du cerveau et du pancréas (Pritchett *et al.*, 2011). Des données récentes ont montré que des translocations et des micro-délétions de plus de 1Mb sur le gène *SOX9* provoquent le syndrome de Pierre Robin (PRS) (OMIM 261800), caractérisé par des anomalies cranio-faciales (Benko *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'implication de *Sox9* dans la différenciation testiculaire a été largement étudiée. En effet, *Sox9* est surexprimé dans les gonades mâles au moment de la différenciation sexuelle chez différentes espèces. De plus, il a été constaté que, chez l'homme, une dose supplémentaire de *SOX9* est suffisante pour initier la différenciation testiculaire en l'absence de *SRY* car la duplication de *SOX9* conduit à une inversion sexuelle des individus XX (Huang *et al.*, 1999). *Sox9* peut même substituer à *Sry* en dirigeant la détermination mâle d'une souris XX lorsqu'il est exprimé ectopiquement sous le contrôle de la région régulatrice de *Wt1* (*Wilms tumor protein*) (XX *Wt1:Sox9^{Tg/+}*) (Vidal *et al.*, 2001) et chez les mutants *Ods/+* (XX *Ods/+*) (*ocular degeneration with sex reversal*) (Bishop *et al.*, 2000). Donc, la surexpression de ce gène chez les souris XX induit la différenciation testiculaire et le développement de mâles XX stériles malgré l'absence de *Sry*. À l'inverse, l'inactivation de *Sox9* avant la détermination sexuelle (dans des gonades XY *Sox9^{-/-}*) conduit à une inversion sexuelle mâle-

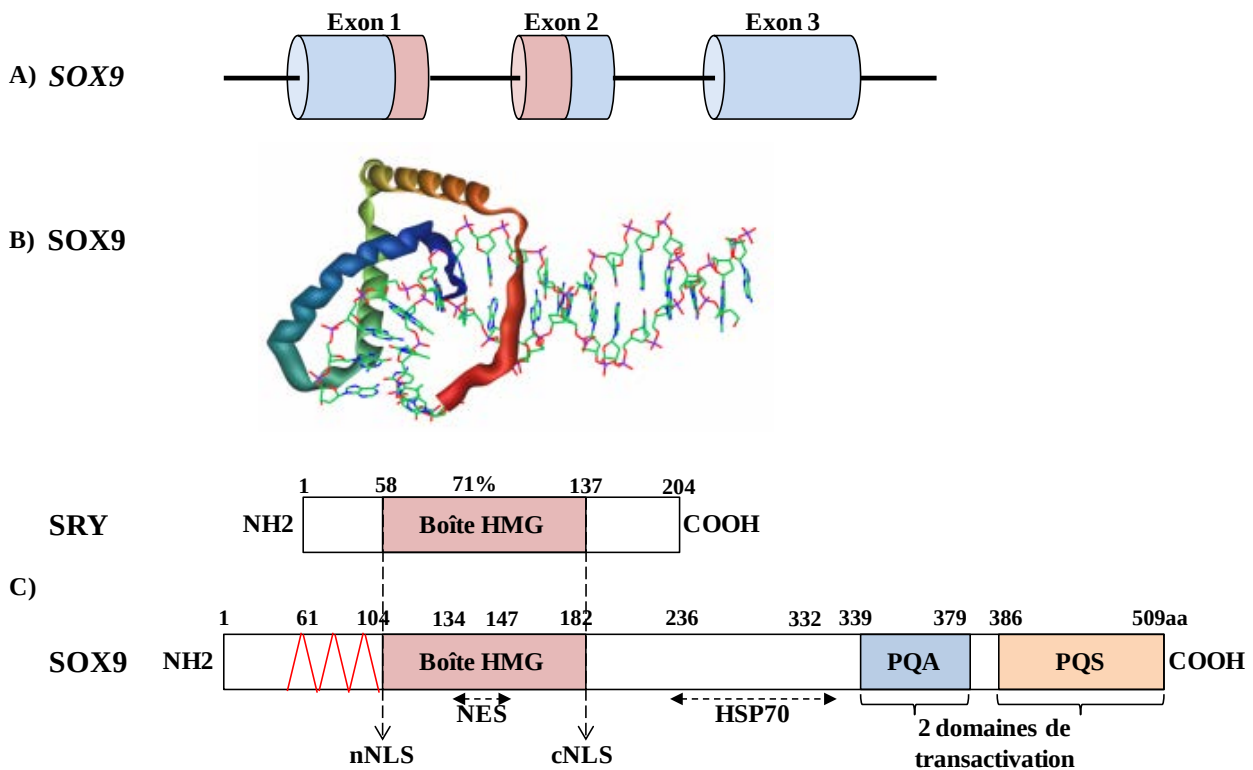


Figure 19 : Structure moléculaire du gène SOX9 et de la protéine SOX9 humains. A) Organisation génomique du gène SOX9 humain : les trois exons sont représentés dans les cadres bleus et le trait correspond aux introns. Le domaine HMG est représenté dans deux cadres roses séparés par le premier intron. **B)** Un modèle tridimensionnel de la protéine SOX9. **C)** Comparaison entre les protéines SRY et SOX9 humaines. SRY contient 204 aa, alors que SOX9 compose 509 aa. Les différents domaines de SOX9 sont représentés par des rectangles de couleurs différentes. La boîte HMG dans un cadre rose est localisée dans la partie N-terminale. Les signaux de localisation nucléaire nNLS et cNLS se trouvent de part et d'autre du domaine HMG. Le signal d'export nucléaire (NES) est localisé au centre de la boîte HMG (acides aminés 134-147). Les domaines de transactivation PQA et PQS sont situés dans la partie C-terminale. Le domaine d'interaction avec la protéine HSP70 est indiqué par une flèche (d'après Foster *et al.*, 1994; Clarkson & Harley, 2002).

femelle observée par l'absence des structures testiculaire ainsi que par l'expression des marqueurs ovariens tels que *Fst* (*Follistatin*), *Bmp2* (*Bone morphogenetic protein 2*), *Wnt4* (*Wingless-related murine-mammary-tumour-virus integration site 4*) et *Foxl2* (Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2006). Récemment, des souris mutantes (XY *Sf1:Cre^{Tg/+}*; *Sox9^{flox/flox}*), ayant une perte de fonction de *Sox9*, montrent une inversion femelle complète et une production d'ovocytes partiellement fertiles XY (Lavery *et al.*, 2011). En conclusion, SOX9 est nécessaire et suffisant pour induire la formation testiculaire, pouvant se substituer à *Sry* en dirigeant la détermination mâle (Barrionuevo *et al.*, 2012; Parma & Radi, 2012).

II.2.2. Structure moléculaire

Le gène *Sox9*, localisé sur les chromosomes 17 et 11 chez l'homme et la souris respectivement, contient trois exons (Figure 19A) (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1995). Il est très conservé chez les vertébrés et code pour une protéine de 509 aa (Figure 19B). SOX9 possède trois domaines nécessaires à sa fonction (Barrionuevo *et al.*, 2012). Le domaine HMG, contenant 79 aa et présentant 70% d'homologie avec celui de SRY. Il se lie spécifiquement à l'ADN favorisant la transcription de gènes cibles tels que l'*Amh* (dans les gonades), ou *Col2a1* (Collagène Type II Alpha 1) (dans les chondrocytes) (Bell *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 1997; de Santa Barbara *et al.*, 1998a; Arango *et al.*, 1999). En plus de cette boîte HMG, la protéine SOX9 est caractérisée par la présence des deux domaines de trans-activation dans la partie C-terminale (Figure 19C). Il s'agit du domaine PQA, composé de 41 aa chez l'homme et riche en proline, glutamine et alanine (Wagner *et al.*, 1994), et du domaine PQS riche en proline, glutamine et serine (Südbeck *et al.*, 1996). Le domaine PQA de SOX9 varie légèrement en longueur et en séquence entre les espèces tandis que le domaine PQS est hautement conservé (Südbeck *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1997). Ces deux domaines PQA et PQS interagissent avec d'autres protéines pour induire la trans-activation. La plus grande activité de trans-activation est conférée au domaine PQS. Cependant, PQA est nécessaire pour obtenir une trans-activation maximale (McDowall *et al.*, 1999). SOX9 contient aussi un domaine conservé et nécessaire à la dimérisation ADN-dépendante à l'extrémité N-terminale (Sock *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2003). Cette dimérisation est effective dans la chondrogenèse mais pas dans la détermination du sexe où il agit en monomère (Bernard *et al.*, 2003).

Comme SRY, SOX9 est une protéine nucléaire possédant deux séquences d'adressage nucléaire NLS (*Nuclear Localisation Signal*), situées aux extrémités N et C terminales de la boîte HMG (Figures 19 et 20). Ces deux séquences permettent le transport de SOX9 du

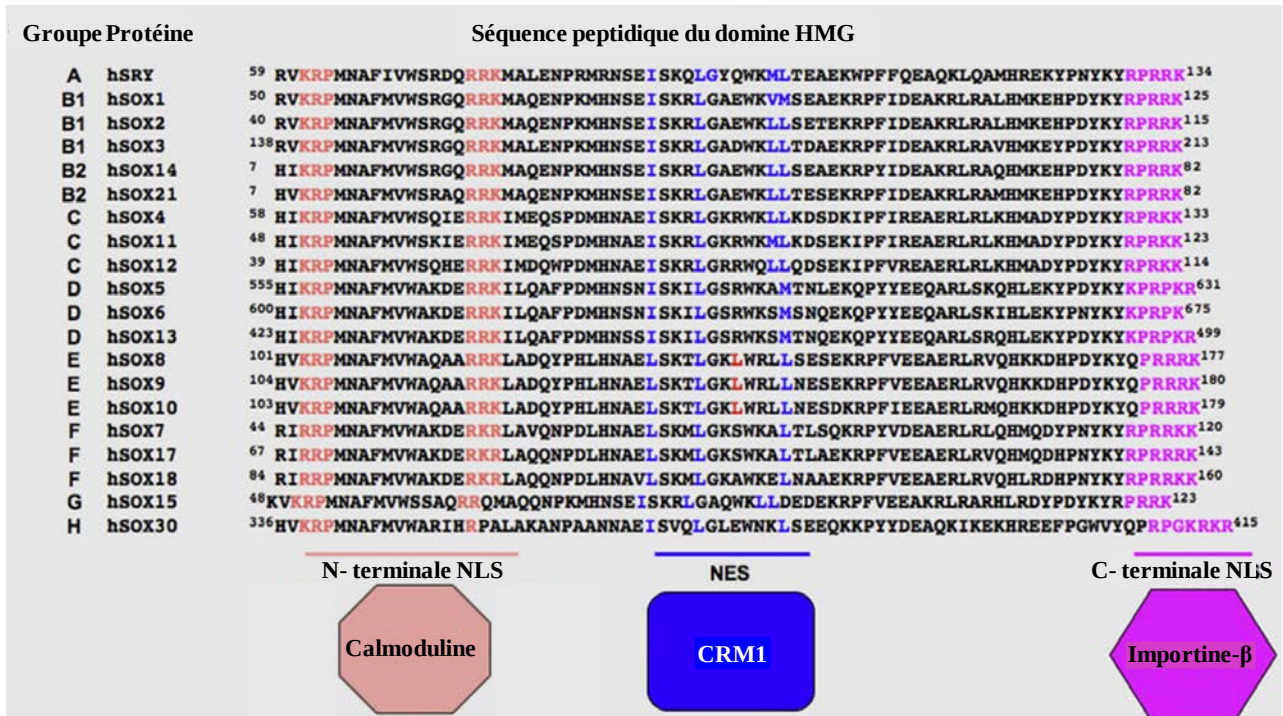


Figure 20 : Séquences conservées dans le domaine HMG de SOX9 concernant la translocation nucléo-cytoplasmique. L'importation nucléaire de SOX9 se produit grâce à deux signaux distincts de la localisation nucléaire (NLS) dans le domaine HMG : (i) une NLS bipartite située dans la partie N-terminale de la boîte HMG (en rose) et comprenant deux groupes de résidus basiques séparés par environ 11-12 aa, ce motif pouvant se lier à la calmoduline. (ii) une NLS dans l'extrémité C-terminale de la boîte HMG, contenant un motif unique (en violet) qui interagit avec l'importine-β. L'exportation nucléaire de SOX9 vers le cytoplasme est contrôlée par les récepteurs d'exportation appelés « exportines » comme le CRM1 qui interagit avec une séquence peptidique courte, hydrophobe et riche en leucine, située au sein de la boîte HMG de SOX9 et nommée « signal d'export nucléaire » (NES) (en bleu) (d'après Malki *et al.*, 2010).

cytoplasme vers le noyau (Südbeck & Scherer, 1997) par l'interaction de nNLS et cNLS avec la calmoduline et l'importine- β respectivement (Preiss *et al.*, 2001; Clarkson & Harley, 2002; Argentaro *et al.*, 2003). De la même manière, il existe également une séquence d'export nucléaire, appelée NES (*Nuclear Export Signal*) afin d'exporter SOX9 hors du noyau. Elle est localisée entre les deux NLS, dans la boîte HMG, et s'étend des aa 134 à 147. Cette courte séquence hydrophobe riche en résidus leucine est conservée parmi les autres protéines SOX chez les mammifères (Gasca *et al.*, 2002).

Enfin, une interaction de SOX9 avec la protéine HSP70 (*Heat Shock Protein 70*) a été identifiée dans des lignées cellulaires testiculaires et chondrocytaires (Marshall & Harley, 2001). Elle contient des séquences hautement conservées parmi les protéines SOX-E et implique la partie C-terminale de la protéine HSP70 avec les 100 aa situés entre la boîte HMG et le domaine PQA de la protéine SOX9 (les aa 236-332). Jusqu'à présent, la fonction de cette interaction est inconnue (Marshall & Harley, 2001; Harley *et al.*, 2003).

II.2.3. Localisation subcellulaire

Chez les mammifères, SOX9 est exprimé uniquement dans le cytoplasme de cellules somatiques dans les gonades indifférenciées. Lors de la différenciation, SOX9 se déplace vers le noyau chez le mâle, alors que la protéine reste cytoplasmique et disparaît rapidement chez la femelle (da Silva *et al.*, 1996; de Santa Barbara *et al.*, 2000). En effet, il a été montré que la localisation cytoplasmique de SOX9 dans les précurseurs des cellules de Sertoli avant la différenciation testiculaire est due au trafic nucléo-cytoplasmique contrôlé par les deux séquences NLS et la séquence NES. Ainsi, un traitement des gonades XX de souris cultivées *in vitro* par la leptomycine B, inhibiteur de l'export nucléaire, a conduit au maintien de la localisation nucléaire de SOX9 et à l'activation de son gène cible l'*Amh*, entraînant donc une inversion sexuelle mâle (Gasca *et al.*, 2002; Malki *et al.*, 2005). De plus, les mutations au niveau des signaux d'import nucléaire (nNLS et cNLS) affectent l'activation des gènes impliqués dans la formation du cartilage et du testicule (Preiss *et al.*, 2001; Argentaro *et al.*, 2003; Harley *et al.*, 2003; Sim *et al.*, 2008). Ce qui suggère que la localisation subcellulaire (cytoplasmique ou nucléaire) de SOX9, elle-même dépendante des séquences NLS et NES, permet de moduler des processus de la différenciation et du développement.

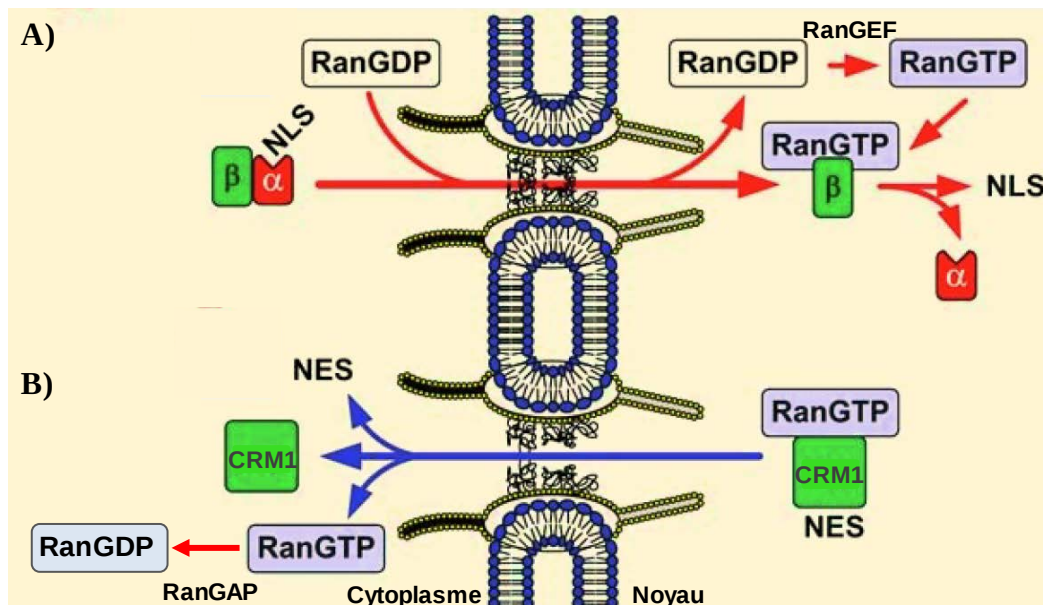


Figure 21 : Modèle simplifié du transport nucléo-cytoplasmique de SOX9 dépendant de la voie RanGTP. A) L'importation nucléaire de SOX9 avec le signal de localisation nucléaire (NLS) est médiée par l'hétérodimère karyophérine- α /importine- β (désignée par α et β) se liant à la nucléoporine RanBP2 située au niveau des filaments cytoplasmiques des complexes des pores nucléaires. La dissociation intra-nucléaire se produit *via* la fixation de RanGTP à l'importine- β entraînant la dissociation de SOX9 et la nucléoporine par un mécanisme allostérique. Pour maintenir un fort niveau de RanGTP dans le noyau, l'enzyme RanGEF convertit le RanGDP en RanGTP **B)** l'exportation nucléaire se produit par la sortie du complexe SOX9/CRM1/RanGTP se formant uniquement dans le noyau vers le cytoplasme où la dissociation se réalise lors de l'hydrolyse du GTP en GDP favorisée par l'enzyme RanGAP (d'après Sorokin *et al.*, 2007).

II.2.4. Le système d'import nucléaire de la protéine SOX9

L'importation nucléaire de SOX9 semble se réaliser grâce aux activités des deux signaux distincts de localisation nucléaire (NLS) dans le domaine HMG : (i) une NLS bipartite, située dans la partie N-terminale de la boîte HMG, comprenant deux groupes de résidus basiques séparés par environ 11-12 aa, et (ii) une NLS, dans l'extrémité C-terminale de la boîte HMG, contenant un motif unique (Figure 20). Les deux NLS utilisent différents mécanismes moléculaires permettant à la protéine SOX9 de se déplacer vers le noyau. Ces mécanismes sont contrôlés par différentes voies de signalisation.

II.2.4.1. N-terminale NLS : la voie de calmoduline/Ca²⁺

Le motif nNLS de SOX9 comprend deux séquences basiques séparées par 11 résidus (KRPxxxxxxxxxxRRK). Ce motif se lie à la fois *in vitro* et *in vivo* à la calmoduline (CaM) (Harley *et al.*, 1996; Argentaro *et al.*, 2003), une protéine intracellulaire dépendante du calcium (Ca²⁺) que l'on trouve à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules. L'import nucléaire via la CaM a été récemment décrit. Ainsi, l'activation de la CaM, suite à une concentration cytoplasmique élevée de Ca²⁺, favorise son interaction avec certaines protéines notamment les kinases et les phosphatases (Thorogate et Torok, 2007). Ceci facilite la translocation de SOX9 à travers les complexes des pores nucléaires (NPC) par un processus moléculaire qui est encore inconnu (Sim *et al.*, 2008; Hanover *et al.*, 2009; Wagstaff & Jans, 2009).

II.2.4.2. C-terminale NLS : la voie importine-β

Ce motif, fortement basique (RxRRRKxR), appartient à la classe des NLS mono-partite initialement décrits dans l'antigène T de SV40 (*Simian Virus* 40) (Kalderon *et al.*, 1984). Il interagit avec l'importine-β, une protéine transporteuse de la famille de karyophérines. Le complexe, SOX9/importine-β, se lie ensuite à la nucléoporine RanBP2 située au niveau des filaments cytoplasmiques des NPC, conduisant donc la translocation nucléaire. La dissociation intra-nucléaire se produit par la suite via une voie dépendante de RanGTP (Forwood *et al.*, 2001). Ce dernier se fixe à l'importine-β et entraîne la dissociation de SOX9 et la nucléoporine par un mécanisme allostérique. Le complexe RanGTP/importine-β sort ensuite du noyau vers le cytoplasme où le GTP sera hydrolysé. Le RanGDP relargué retourne dans le noyau laissant le récepteur libre de se fixer à une autre protéine. Pour maintenir un fort niveau de RanGTP dans le noyau, l'enzyme RCCI ou RanGEF (*Ran Guanine Exchange Factor*) convertit le RanGDP en RanGTP (Figure 21) (Sorokin *et al.*, 2007; Wagstaff & Jans, 2009).

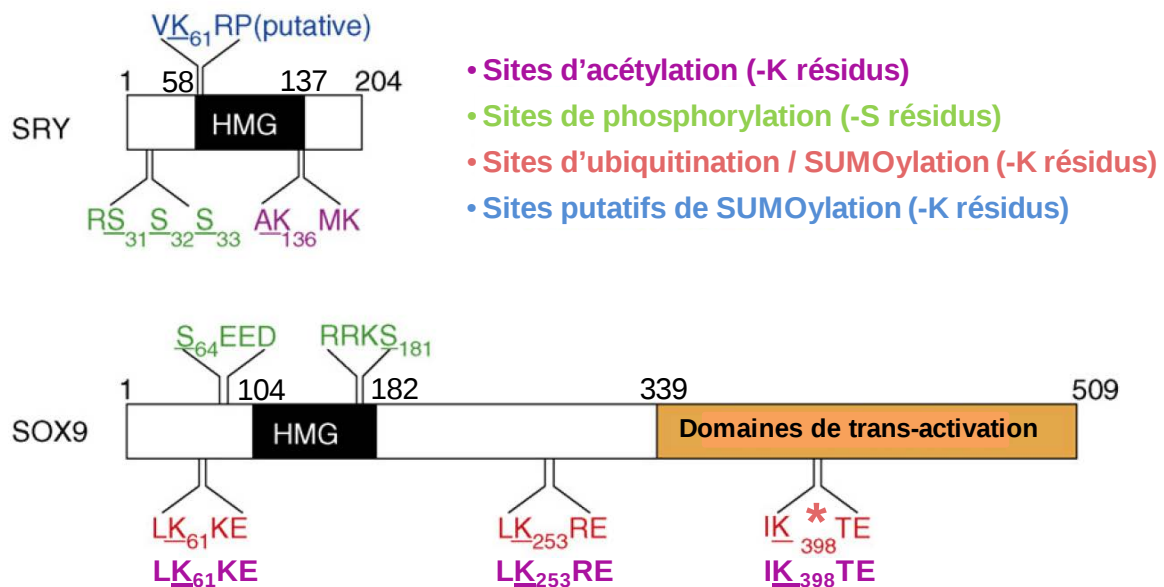


Figure 22 : Localisation des sites confirmés et putatifs des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, et SUMOylation/ubiquitination) dans les protéines SRY et SOX9 humaines. Le domaine HMG hautement conservé entre SRY et SOX9 contient également quelques sites soumis à des modifications post-traductionnelles. Dans la protéine SRY, un seul site d'acétylation a été identifié (K₁₃₆, en violet) alors que trois sites de phosphorylation ont été identifiés (S₃₁, S₃₂ et S₃₃, en vert). Des sites putatifs de SUMOylation pour SRY ont été prédits en utilisant le programme SUMOplot, mais un seul site ayant la plus grande probabilité est représenté sur cette figure (K₆₁, en bleu). Dans la protéine SOX9, les trois sites d'acétylation K₆₁, K₂₅₃ et K₃₉₈ (en violet) sont également des cibles de SUMOylation (en rouge). En plus, (*) indique que le résidu K₃₉₈ situé à l'intérieur du domaine transactionnel de SOX9 a été rapporté pour être soit SUMOylé ou ubiquitiné. Deux sites de phosphorylation ont été identifiés (S₆₄ et S₁₈₁, en vert) (d'après Sim *et al.*, 2008).

II.2.5. L'export nucléaire de la protéine SOX9

L'exportation nucléaire de SOX9 vers le cytoplasme est contrôlée par les récepteurs d'exportation appelés « exportines ». Un des récepteurs le plus étudié est le CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*). Il interagit avec une séquence peptidique courte, hydrophobe et riche en leucine, située au sein de la boîte HMG de SOX9 et nommée «signal d'export nucléaire" (NES) (Fried & Kutay, 2003) (Figure 20). Le complexe SOX9-CRM1-RanGTP se formant uniquement dans le noyau sort vers le cytoplasme où la dissociation se réalise lors de l'hydrolyse du GTP en GDP favorisée par l'enzyme RanGAP (*Ran GTPase Activating Protein*). Le RanGDP et le récepteur d'exportation retournent séparément dans le noyau (Figure 21) (Sorokin *et al.*, 2007; Malki *et al.*, 2010).

La séquence NES a été fonctionnellement caractérisée dans deux membres du groupe SOX-E : SOX9 (Gasca *et al.*, 2002) et SOX10 (Rehberg *et al.*, 2002). Le CRM1 peut être inhibé par la présence de leptomycine B qui empêche l'interaction avec NES et par conséquent l'export nucléaire (Gasca *et al.*, 2002; Rehberg *et al.*, 2002).

II.2.6. Les modifications post-traductionnelles de SOX9

Les protéines SOX, y compris SOX9, subissent des modifications post-traductionnelles (MPTs) qui agissent sur leur activité à différents niveaux, en contrôlant leur affinité pour l'ADN, leur activité transcriptionnelle, ou encore leur distribution nucléocytoplasmique. Plusieurs modifications ont été illustrées comme la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation et la SUMOylation (Akiyama, 2008; Sim *et al.*, 2008; Bernard & Harley, 2010).

Phosphorylation : SOX9 contient un certain nombre de sites de phosphorylation dont cinq sites de la protéine kinase C (PKC) et deux sites de la protéine kinase A (PKA). Elle améliore sa capacité à trans-activer *Col2a1*, un des gènes spécifiques des chondrocytes, en interagissant spécifiquement avec la sous-unité catalytique de la PKA- α (*cyclic AMP (cAMP)-dependent protein kinase A*) au niveau de la sérine 64 et de la sérine 181 (S₆₄ et S₁₈₁), situées dans les extrémités N et C terminales de la boîte HMG respectivement (Figure 22). Dans le cartilage, une signal de l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) (*parathyroid-hormone-related protein*) favorise la phosphorylation de SOX9 et améliore son activité transcriptionnelle, sans avoir aucun effet sur la localisation nucléaire de SOX9 (Huang *et al.*, 2000). Au niveau des gonades, Malki *et al.*, (2005) ont montré que la prostaglandine D2 (PGD2) se fixe à son récepteur DP1 stimulant la voie de PKA, et induisant, par conséquent, la phosphorylation de

SOX9 et sa translocation nucléaire *via* l'importine- β dans la lignée de carcinome embryonnaire testiculaire humain NT2/D1. Le traitement par la PGD2 ou l'agoniste de DP1, BW245C, induit un phénotype mâle dans les gonades XX de souris en culture organotypique, en favorisant la translocalisation nucléaire de SOX9 et stimulant l'expression de l'*Amh*.

Acétylation : Le transfert d'un groupe acétyle sur un résidu de lysine dans un motif consensus conservé, peut réguler l'activité des facteurs de transcription. En effet, la fonctionnalité de SOX9 nécessite son acétylation dans les chondrocytes. SOX9 interagit avec TIP60 (*Tat interactive protein-60*) qui ajoute un groupe acétyle au niveau des lysines 61, 253 et 398 (K₆₁, K₂₅₃ et K₃₉₈) de SOX9 (Figure 22), ceci augmente la translocation nucléaire de SOX9 et TIP60 (Hattori *et al.*, 2008). D'ailleurs, il a été montré que le domaine de transactivation de la partie C-terminale de SOX9 se lie aux protéines CBP (*CREB (cAMP response element-binding)-binding protein*) et son paralogue p300, appelée HATS (*Histone Acetyltransferase*), *in vitro* et *in vivo*, afin d'améliorer son activité transcriptionnelle sur le promoteur *Col2a1* au cours de la chondrogenèse (Tsuda *et al.*, 2003). En plus, Smad3, une molécule de signalisation des composés de la famille TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), stimule l'activation de la transcription dépendante de SOX9 en modulant l'interaction entre SOX9 et CBP/p300 (Furumatsu *et al.*, 2005, 2009; Furumatsu & Asahara, 2010). D'autres études ont montré que l'acétylation de SRY par HATS au niveau de la lysine 136 (K₁₃₆) (Figure 22) favorise son importation nucléaire *via* l'importine β . Par contre, la désacétylation de SRY par HDAC3 (*Histone Desacetylase 3*) conduit à la délocalisation partielle de SRY vers le cytoplasme (Thevenet *et al.*, 2004).

SUMOylation/Ubiquitination : La SUMOylation (*Small Ubiquitin-like Modification*) est un mécanisme proche de l'ubiquitination, basé sur le même principe de conjugaison d'un petit peptide sur une protéine substrat. En revanche, à l'inverse de l'ubiquitination le phénomène de SUMOylation ne dirige pas les protéines substrat vers la dégradation par le protéasome, mais modifie divers paramètres fonctionnels des protéines SUMOylées. Ces paramètres incluent, de façon non exhaustive, la localisation sub-cellulaire, les interactions protéine-protéine, la liaison à l'ADN et/ou la fonction transactivatrice de facteurs de transcription. Les mêmes sites d'acétylation dans la protéine SOX9 sont également des cibles de SUMOylation (K₆₁, K₂₅₃ et K₃₉₈) (Figure 22) (Hattori *et al.*, 2006, 2008). Il a été montré que l'enzyme SUMO-ligase, appelée PIAS (*protein inhibitor of activated STAT 1*) se lie à SOX9 et conduit

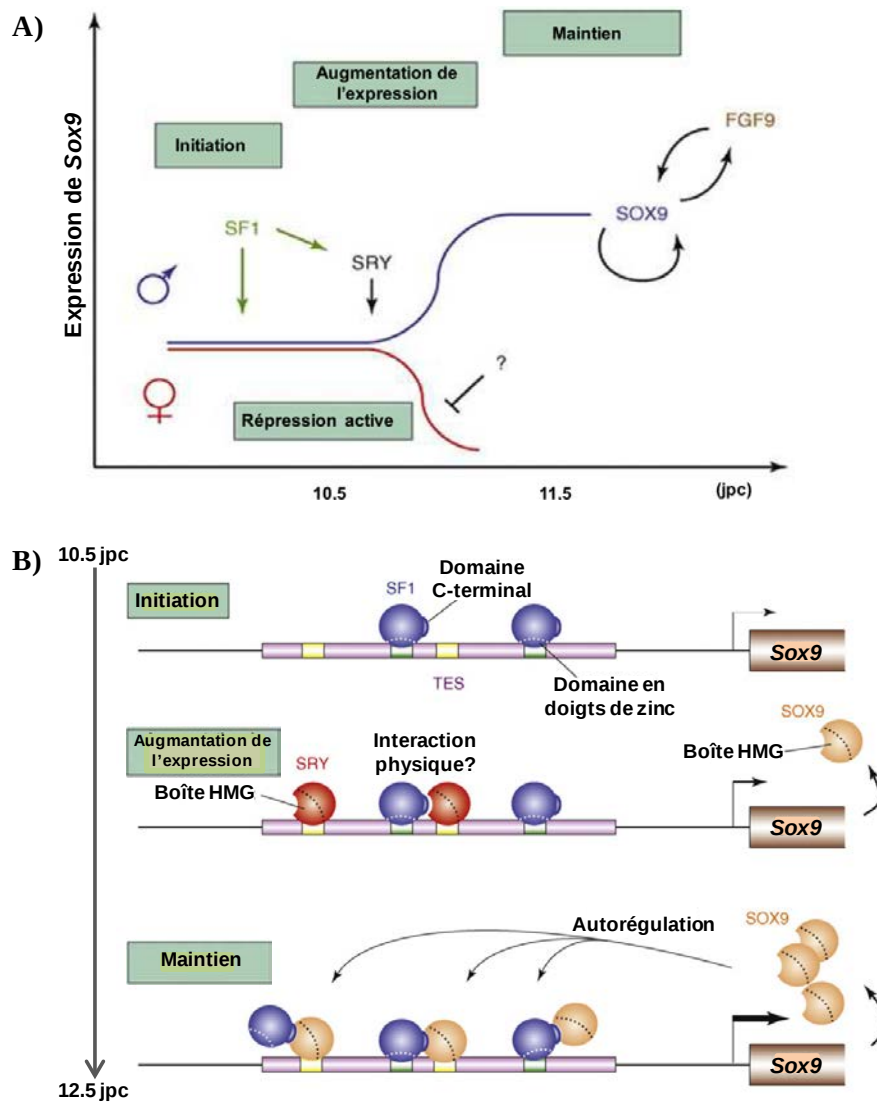


Figure 23 : Modèle représentant la régulation transcriptionnelle de Sox9 dans la gonade.

A) Chez le mâle, la régulation transcriptionnelle gonadique de Sox9 comprend trois phases : (i) initiation de la transcription indépendante de SRY ; (ii) augmentation de l'expression dépendante de SRY ; (iii) maintien de l'expression en absence de SRY. Ainsi chez le mâle, SF1 active l'expression de Sry. L'expression de Sox9 augmente à environ 11,5 jpc par une action synergique de SRY et SF1, tandis que chez la femelle, l'expression de Sox9 diminue à ce stade de développement. Le maintien de l'expression de Sox9 après la disparition de Sry est dû à une autorégulation directe de SOX9 et également à FGF9. **B)** SF1 se lie à son site spécifique (en vert) dans TESCO (*Testis-specific Enhancer core*) via son domaine en doigt de zinc (pointillé blanc) à 10,5 jpc. Lorsque SRY est exprimé, il se lie à son site (en jaune) dans TESCO via sa boîte HMG (pointillé noir) et coopère avec SF1 afin d'activer l'expression de Sox9. À son tour, SOX9, également avec SF1, maintient sa propre expression en se liant directement à TESCO en remplacement de SRY (d'après Sekido & Lovell-Badge, 2008).

à une augmentation des niveaux de SOX9, prévenant donc sa dégradation. PIAS a également un effet synergique sur l'activation par SOX9 du promoteur de *Col2α1*. En outre, la SUMOylation de SOX9 favorise une modification de la localisation subnucléaire ; on passe d'une distribution nucléaire ponctuelle à une distribution diffuse (Hattori *et al.*, 2006). À l'inverse, une autre étude a montré que seulement le K₃₉₈ est un site important de SUMOylation, et que PIAS réprime l'activité transcriptionnelle de SOX9 sur le promoteur de *Col11α1* ; ainsi il modifie la localisation subnucléaire, d'une distribution nucléaire diffuse à une distribution ponctuelle (Oh *et al.*, 2007). Ces données indiquent que la SUMOylation des protéines SOX induit des effets différents selon le promoteur étudié. Il est important à noter qu'un site d'une MPTs pourrait être la cible de plusieurs modifications, telle que la K₃₉₈ de SOX9 qui est une cible d'acétylation, SUMOylation et ubiquitination (Akiyama *et al.*, 2005; Hattori *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2008) et l'équilibre entre ces trois MPTs est important pour la stabilité de la protéine SOX9 et donc pour son activité transcriptionnelle (Bernard & Harley, 2010). Enfin, la localisation de Ranbp2, un substrat de SUMOylation, aux niveaux des pores nucléaires (Saitoh *et al.*, 2006), suggère que le trafic nucléo-cytoplasmique de SOX9 à travers ces pores pourrait induire sa SUMOylation.

II.2.7. La régulation transcriptionnelle du gène *Sox9* dans les gonades

Etant donné que *Sox9* joue un rôle important dans la détermination testiculaire, il est donc nécessaire d'étudier la régulation de sa transcription. Chez la souris, *Sox9* est d'abord exprimé à 10,5 jpc (jours post-coïtum) dans les gonades bipotentielles chez les embryons des deux sexes. À 11,5 jpc, le niveau de transcrits augmente nettement dans les gonades mâles tandis qu'il diminue chez les femelles (Kent *et al.*, 1996; da Silva *et al.*, 1996; Sekido *et al.*, 2004; Kanai *et al.*, 2005).

Récemment, un élément régulateur de 3,2 kb responsable de l'expression spécifique de la différenciation testiculaire a été identifié dans le gène *Sox9*. Cet élément situé 11-13 kb en amont du promoteur de *Sox9* est nommé TES (*Testis-specific Enhancer of Sox9*). Une séquence de 1,4 kb au sein de TES appelée TESCO (*TES core*) a été déterminée par des analyses de ChIP (*Chromatin Immuno-Precipitation*) (Sekido & Lovell-Badge, 2008, 2009). TESCO contient une région de 180 paire de bases (pb) très conservée chez les marsupiaux (opossum), les monotrèmes (platypus), les oiseaux (poulet), les reptiles (lézard *Anolis carolinensis*) et les amphibiens (*Xenopus tropicalis*) (Bagheri-Fam *et al.*, 2010; Sekido & Lovell-Badge, 2013). TESCO contient également trois sites de liaison spécifiques à la famille

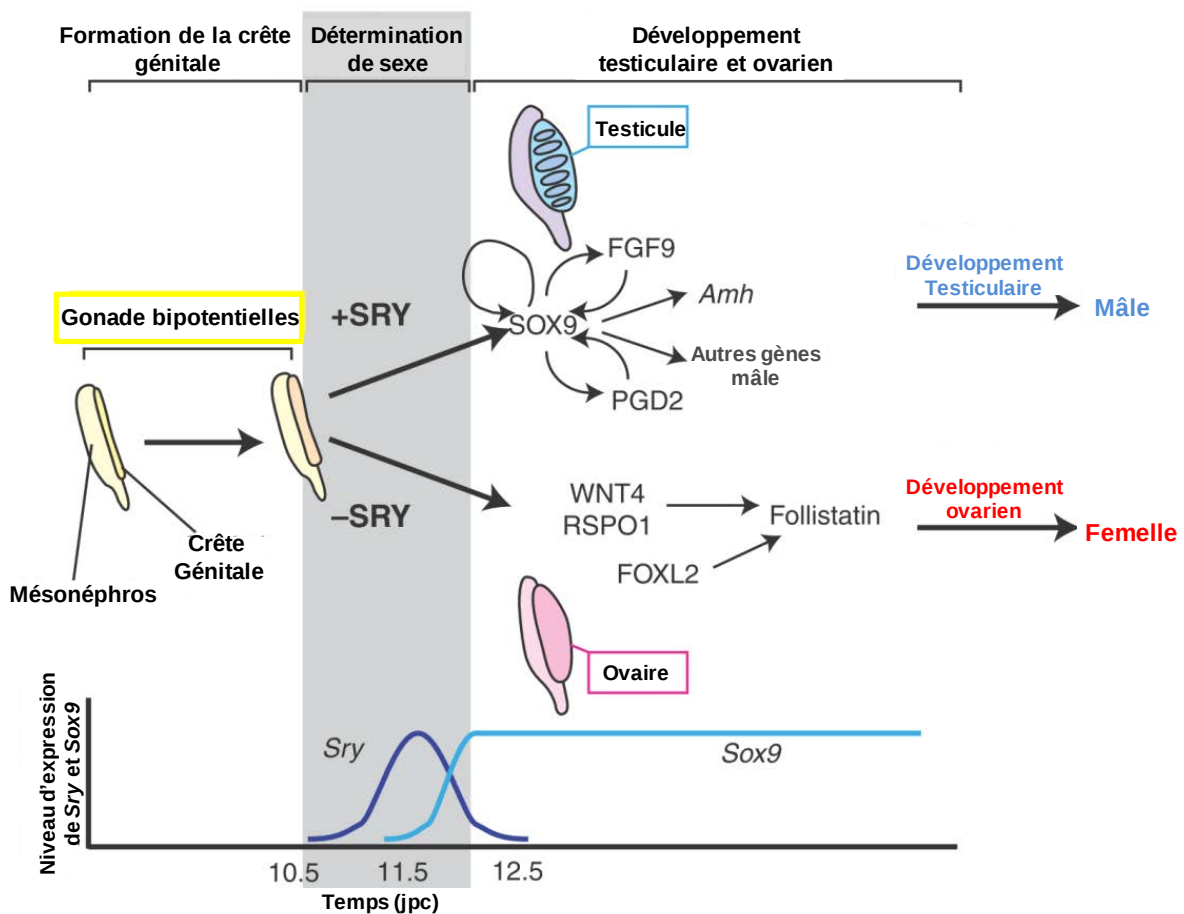


Figure 24 : Représentation simplifiée de la différenciation du sexe chez la souris. Dans les cellules somatiques des crêtes génitales, peu après le début de l'expression de *Sry* (en bleu foncé) chez les embryons XY, l'expression de *Sox9* (en bleu clair) est activée pour induire la différenciation des cellules de Sertoli. Après le pic d'expression à 11,5-12,5 jpc, *Sox9* continue de s'exprimer après la naissance et est soutenu par plusieurs boucles de rétroaction positives (y compris fibroblast growth factor 9 (FGF9), la prostaglandine D2 (PGD2) et SOX9 lui-même). En effet, SOX9 favorise l'expression de *Fgf9* qui va à son tour, en se fixant à son récepteur (FGFR2), maintenir l'expression de *Sox9*. De plus, SOX9 se lie directement au promoteur du gène codant la Prostaglandine synthase (*Ptgds*) impliquée dans la production de la PGD2 qui maintient quant à elle l'expression de *Sox9*. Par la suite, SOX9 active de nombreux gènes spécifiques de la voie mâle, y compris l'*Amh*. À 12,5 jpc, les cordons testiculaires sont formés, et les différences morphologiques entre le testicule (bleu) et l'ovaire (rose) sont évidents. En l'absence de SRY, les gènes comme *Wnt4*, *Rspo1* et *Foxl2*, exprimés d'une manière femelle-spécifique, induisent le développement ovarien caractérisé par l'expression de follistatine et nombreux d'autres gènes ovariens (d'après Kashimada & Koopman, 2010).

SOX ainsi que six sites spécifiques de SF1. L'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) et la mutagenèse de TESCO *in vivo* ont démontré que la régulation transcriptionnelle de *Sox9* se produit en trois étapes (Figure 23) : (i) initiation de la transcription de *Sox9* via la liaison de SF1 à TESCO ; (ii) augmentation de l'expression par une action synergique de SRY et SF1 après leur fixation spécifique sur TESCO ; (iii) maintien de cette expression par l'autorégulation positive de SOX9. Ainsi, cette dernière agit en synergie avec SF1 en se fixant à TESCO afin de maintenir sa propre expression (Sekido & Lovell-Badge, 2008, 2009; Wainwright & Wilhelm, 2010; Jakob & Lovell-Badge, 2011; McClelland *et al.*, 2012).

Il a été montré que plusieurs autres gènes peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'expression de *Sox9* en agissant directement sur TESCO soit d'une manière positive, favorisant par conséquent le développement testiculaire, soit d'une manière négative entraînant le développement ovarien (Figure 24). En effet, peu après l'expression de *Sox9*, deux autres boucles de régulation sont mises en place via FGF9 (*Fibroblast Growth Factor 9*) et PGD2 (*Prostaglandin D2*). (i) SOX9 favorise l'expression de *Fgf9* qui va, à son tour comme protéine (FGF9), maintenir l'expression de *Sox9* à travers le FGFR2 (*FGF Receptor 2*) en faisant une boucle de rétroaction (Kim *et al.*, 2006, 2007). Ainsi, l'inactivation du gène *Fgf9* ou *Fgfr2* provoque une diminution de l'expression de *Sox9* conduisant à une inversion sexuelle des souris XY (Colvin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007; Bagheri-Fam *et al.*, 2008). (ii) SOX9 se lie directement au promoteur du gène codant la lipocalin prostaglandine D synthase (*L-Ptgds* ou *Ptgds*) impliquée dans la production de la PGD2 (Wilhelm *et al.*, 2007). La signalisation autocrine et/ou paracrine de PGD2 favorise la translocation nucléaire de SOX9 et facilite la différenciation des cellules de Sertoli (Malki *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2005). Chez les souris *Ptgds*^{-/-}, l'expression de *Sox9* diminue et la translocation nucléaire semble être tardive dans les gonades XY (Moniot *et al.*, 2009). Donc, chez la souris, la boucle de régulation des gènes *Ptgds* et *Sox9*, agissent en parallèle de la boucle de régulation FGF9/*Sox9* afin de maintenir l'expression de *Sox9* et d'induire la formation des cordons séminifères.

D'autres protéines SOX comme SOX8 ou SOX10 pourraient aussi être impliquées dans cette régulation. En effet, ils sont exprimés dans les cellules de Sertoli peu de temps après l'activation de *Sox9*. L'inactivation de *Sox8* chez les souris XY n'a pas induit une inversion sexuelle mais le double mutant de *Sox8* et *Sox9* a montré un rôle redondant immédiat de ces gènes après l'activation de *Sox9* au cours du développement et le maintien de cellules de Sertoli (Barrionuevo *et al.*, 2009; Barrionuevo & Scherer, 2010). La même régulation pourrait être impliquée pour SOX10. Ainsi, les mutations de ce gène chez l'homme et la souris

n'entraînent pas une inversion de sexe, cependant l'expression ectopique de SOX10 active l'expression du *Sox9* dans les gonades XX conduisant au développement masculin (Polanco *et al.*, 2010; Jakob & Lovell-Badge, 2011; Barrionuevo *et al.*, 2012).

SOX9, quant à lui, agit en synergie avec d'autres protéines afin de favoriser l'expression de l'*Amh*, un des premiers marqueurs de la différenciation des cellules de Sertoli (voir chapitre suivant) (Sekido & Lovell-Badge, 2013). De plus, des études de co-transfection *in vitro* suggèrent que SOX9 est nécessaire pour activer la transcription de son partenaire activateur, *Sf1*, et maintenir donc l'expression de ce dernier à un niveau élevé dans les cellules de Sertoli au cours de la différenciation testiculaire (Shen & Ingraham, 2002).

À contrario, l'expression de *Sox9* diminue à 11,5 jpc dans les gonades XX des souris *via* des régulateurs négatifs. Cette diminution est maintenue dans les cellules de granulosa au cours du développement fœtal et dans l'ovaire adulte. Ainsi, un certain nombre de gènes ont été proposés pour jouer un rôle en tant que gènes anti-testiculaires ou activateurs ovariens dans les gonades femelles éventuellement *via* une répression directe de *Sox9* : *Foxl2*, *Wnt4*, *Rspo1* (*R-spondin 1*) et β -caténine (Warr & Greenfield, 2012; Sekido & Lovell-Badge, 2013) (Figure 24).

II.2.8. Rôle de SOX9

SOX9 intervient dans un certain nombre de processus de développement chez de nombreuses espèces, tels que la chondrogenèse (Akiyama, 2008), la différenciation de la crête neurale (Hong & Saint-Jeannet, 2005), l'ectoderme otique (Barrionuevo *et al.*, 2008), les cellules épithéliales du bourgeon de prostate (Thomsen *et al.*, 2008), et il est bien connu pour être impliqué dans le développement des gonades (Jiang *et al.*, 2013).

II.2.8.1. Chez les mammifères

En effet, *Sox9* joue un rôle indispensable dans les étapes précoces de la chondrogenèse. Il favorise, chez l'homme, l'expression des gènes de la matrice extracellulaire du cartilage, incluant la chaîne α de collagène de type 2, 9, 11 et 27. Il peut également former un complexe transcriptionnel avec plusieurs protéines, par exemple SOX5 et SOX6, qui intervient dans la régulation de la chondrogenèse (Lefebvre *et al.*, 2007; Pritchett *et al.*, 2011). Des mutations dans SOX9 humaine provoquent une grave perturbation du développement des os appelée dysplasie campomélique (CD) associée à une inversion sexuelle chez environ 75% des patients XY (Gordon *et al.*, 2009).

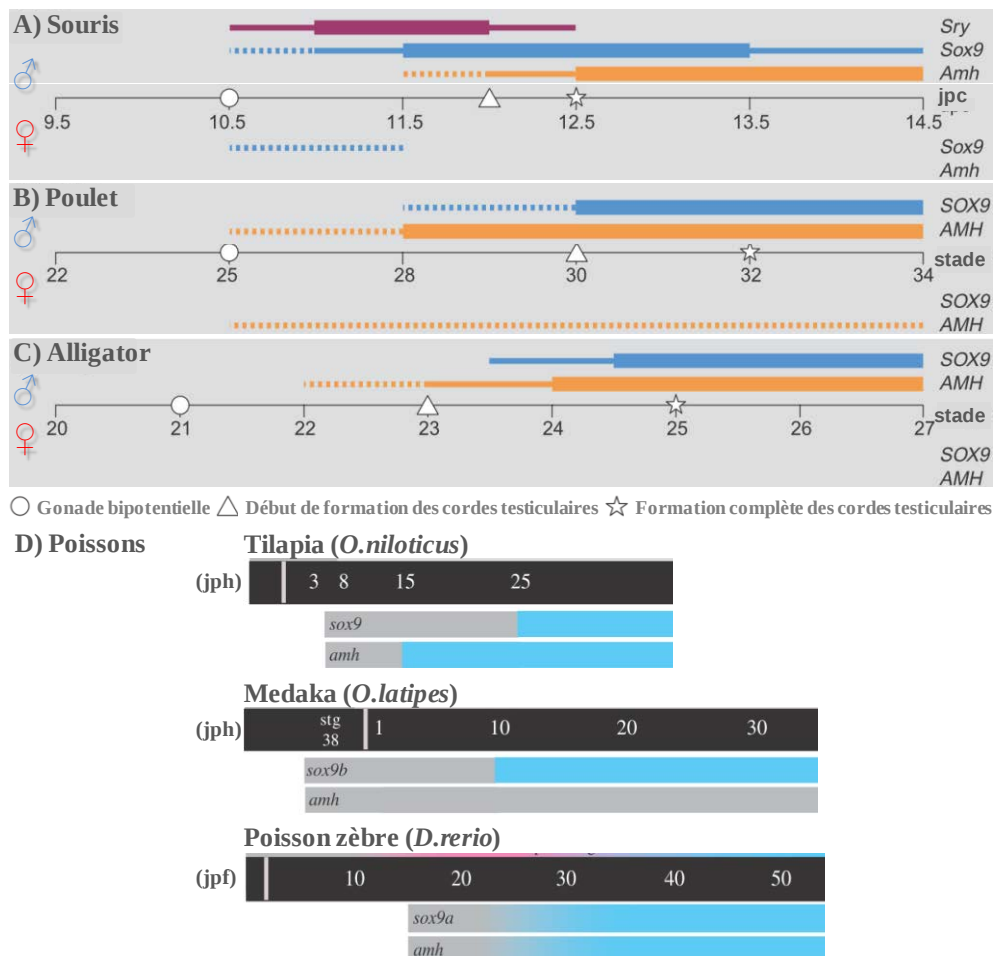


Figure 25 : Expression relative de Sox9 et Amh dans les gonades mâles et femelles pendant la période de détermination du sexe chez différents vertébrés. A) Chez la souris (selon les jours post-coïtum : jpc), B) le poulet et C) l'alligator (selon les stades du développement). Les lignes pointillées indiquent une faible expression, les lignes minces indiquent une expression modérée et les lignes épaisses indiquent une forte expression. D) Chez différents types de poissons : le tilapia (*Oreochromis niloticus*) et le medaka (*Oryzias latipes*) (selon les jours post éclosion : jph) et le poisson-zèbre (*Danio rerio*) (selon les jours post fécondation : jpf). L'éclosion est représentée par une ligne blanche. Le moment de l'expression du gène est représenté sous la barre noire. La couleur grise représente une expression gonadique sans dimorphisme sexuel. L'expression testiculaire est indiquée en bleu (d'après Morrish & Sinclair, 2002; Siegfried, 2010).

De même, l'analyse des mutations, des modèles knock-out ainsi que les études d'expression ont montré que *Sox9* est impliqué dans la différenciation gonadique. Chez les mammifères, *SOX9* est nécessaire pour la différenciation testiculaire. Elle est exprimée en faibles concentrations dans le cytoplasme des cellules somatiques des gonades des deux sexes au début de l'embryogenèse chez la souris et l'homme (da Silva *et al.*, 1996; de Santa Barbara *et al.*, 2000). Dans les gonades XX, *SOX9* reste cytoplasmique et disparaît (à 12,5 dpc chez la souris) tandis que dans les gonades XY, après l'expression de *SRY*, les taux d'ARNm de *Sox9* augmentent significativement dans les cellules de pré-Sertoli et la protéine, quant à elle, se déplace vers le noyau afin de stimuler en synergie avec d'autres partenaires, l'expression de l'*Amh*, un marqueur précoce de la différenciation des cellules de Sertoli (Figure 25) (voir chapitre suivant) (de Santa Barbara *et al.*, 1998a). *Sox9* peut même se substituer à *Sry* en dirigeant la détermination mâle d'une souris XX lorsqu'il est exprimé de façon ectopique sous le contrôle de la région régulatrice de *Wt1* (Vidal *et al.*, 2001) et chez les mutants *Ods/+* (Bishop *et al.*, 2000). *Sox9* est également impliqué dans la différenciation testiculaire chez le wallaby mais les transcrits sont aussi retrouvés dans le scrotum et les glandes mammaires en développement ainsi que dans l'épithélium des canaux de Wolff ce qui suggère un rôle plus large de *SOX9* dans la différenciation du système reproducteur (Pask *et al.*, 2002).

II.2.8.2. Chez les autres vertébrés

Cependant, le rôle de *SOX9* dans la différenciation gonadique varie selon les espèces. En effet, chez le poulet, dont le déterminisme du sexe est de type ZZ/ZW, *SOX9* présente un dimorphisme sexuel durant la différenciation gonadique. Ainsi, l'ARNm de *SOX9* est exprimé à des niveaux plus élevés dans les gonades mâles. Il s'exprime après le début de la différenciation testiculaire plus tardivement que celle de l'*AMH* suggérant que chez cette espèce, *SOX9* n'est pas essentiel dans la régulation de l'expression de cette hormone (Figure 25) (Kent *et al.*, 1996; Oreal *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999; Vaillant *et al.*, 2001a; Smith & Sinclair, 2004; Takada *et al.*, 2006). Récemment, il a été montré que la protéine *SOX9* est exprimée dans les noyaux de cellules de Sertoli chez les mâles, tandis que les femelles n'avaient pas d'expression de *SOX9* (Smith *et al.*, 2009).

Une expression dimorphique de *sox9* a été également décrite chez les reptiles, dont la différenciation sexuelle dépend de la température : *SOX9* augmente à la fin de la période thermosensible TSP à température masculinisante tandis qu'à température féminisante, cette expression reste à un bas niveau (Matsumoto & Crews, 2012). Néanmoins, comme la

situation observée chez les oiseaux, *sox9* ne semble jouer un rôle « mâle spécifique » qu'à la fin de la TSP puisque son expression dimorphique n'apparaît qu'après le début de la différenciation testiculaire suite à l'expression de l'*amh* chez l'alligator (*Alligator mississippiensis*), le gecko léopard (*Eublepharis macularius*) et la tortue olivâtre (*Lepidochelys olivacea*) (Figure 25) (Western *et al.*, 1999a, 1999b; Moreno-Mendoza *et al.*, 1999; Valleley *et al.*, 2001). Á contrario, chez une autre tortue (*Trachemys scripta elegans*), une expression dimorphique de *sox9* a été observée au début de la TSP, précédant l'expression dimorphique de l'*amh*, comme chez les mammifères (Shoemaker *et al.*, 2007; Shoemaker & Crews, 2009). Toutefois, des analyses récentes *in ovo* et *in vitro* ont montré que SOX9 ne semble pas impliquée dans le déclenchement de l'expression de l'*amh* chez *T. scripta*, et que d'autres facteurs, pas encore connus, peuvent réguler l'expression initiale de l'*amh* dans les gonades de la tortue. Ceci n'exclut pas que SOX9 participe au maintien d'un niveau élevé d'AMH dans le testicule fœtal (Shoemaker-Daly *et al.*, 2010). Il est à noter que chez les reptiles, la localisation subcellulaire de SOX9 n'a pas été étudiée.

Chez les poissons, l'expression de *sox9* a été caractérisée chez différentes téléostéens. En effet, deux paralogues *sox9*, nommés *sox9a/a1* et *sox9b/a2*, ont été identifiés chez plusieurs espèces, telles que la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Vizziano *et al.*, 2007), le medaka (*Oryzias latipes*) (Yokoi *et al.*, 2002; Klüver *et al.*, 2005; Nakamoto *et al.*, 2005) et le poisson-zèbre (*Danio rerio*) (Chiang *et al.*, 2001; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005). Chez la truite arc-en-ciel, l'expression de *sox9a1* apparaît plus forte dans les testicules que dans les ovaires, avant la différenciation histologique des gonades. Par contre, chez le tilapia, la surexpression de *sox9* dans les testicules n'apparaît que plus tardivement au cours de la différenciation des gonades (Kobayashi *et al.*, 2008; Ijiri *et al.*, 2008), de même chez le medaka pour *sox9b* (Klüver *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2008), et chez le poisson-zèbre pour *sox9a* également (Chiang *et al.*, 2001; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005). Chez ces espèces, *sox9* est détecté dans les cellules somatiques entourant les CG dans les gonades mâles et femelles. L'expression dimorphique plus tardive dans le testicule du tilapia, du medaka et du poisson-zèbre suggère que Sox9 ne joue pas un rôle dans l'initiation de la différenciation testiculaire, mais plutôt dans le processus de morphogenèse des tubes séminifères (Siegfried, 2010). Par ailleurs, la seconde copie du gène, *sox9a* est curieusement exprimée dans les ovocytes chez le medaka et le poisson-zèbre (Chiang *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2002). Cependant, la fonction de ce gène n'est pas encore connue. Enfin, chez le poisson-zèbre, Sox9a s'exprime dans les cellules de Sertoli avant l'expression de l'*amh* suggérant l'implication de Sox9a dans la régulation de

l'*amh* semblablement aux mammifères (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005). En revanche, chez le tilapia, l'expression dimorphique sexuelle de l'*amh* commence bien avant celle du *sox9* (Figure 25). Ceci suggère que Sox9 n'est pas responsable de la régulation de l'*amh* au cours de la différenciation testiculaire contrairement aux mammifères (Siegfried, 2010).

Chez les amphibiens, uniquement les anoues sont documentées, en particulier les espèces de *Xenopus* dans lesquelles Sox9 est impliquée dans de nombreux mécanismes de développement. Par exemple, chez *Rana rugosa*, deux isoformes (*sox9α* et *sox9β*) ont été isolés. Au cours du développement des têtards, ils ont été trouvés non seulement dans le testicule, mais aussi dans l'ovaire. L'expression mâle-spécifique de l'ARNm *sox9* n'apparaît que deux mois après la métamorphose (Takase *et al.*, 2000). Une expression similaire a été observée chez *Xenopus laevis* (Osawa *et al.*, 2005). Chez *Bufo marinus*, les transcrits de l'ARNm *sox9* sont identiques dans les ovaires et les testicules au moment de la métamorphose, une phase de différenciation présexuelle correspond au stade de 20mm. À ce stade, une expression « mâle-spécifique » a été observée, qui est strictement remplacée par une expression « femelle-spécifique » au stade de 60mm (Abramyan *et al.*, 2009). Contrairement à ces espèces, chez *Xenopus tropicalis*, les ARNm de *sox9* ainsi que la protéine ne sont pas détectables chez les deux sexes jusqu'à la métamorphose où les gonades sont bien différenciés. De plus, cette expression présente un dimorphisme sexuel au niveau de la localisation cellulaire. En effet, Sox9 est exprimé au niveau des noyaux des cellules de Sertoli dans les gonades mâles alors que chez la femelle, cette expression a lieu dans les ovocytes. D'ailleurs, Sox9 subit une translocation nucléaire pendant l'ovogenèse ; son expression a été observée dans le cytoplasme des ovocytes prévitellogénique, puis dans les noyaux des ovocytes vitellogéniques (El Jamil *et al.*, 2008). Ces données obtenues chez les amphibiens suggèrent que (i) Sox9 joue un rôle dans le développement des gonades, mais pas dans la détermination du sexe (Takase *et al.*, 2000), (ii) *sox9* est un peu plus en aval dans la cascade de différenciation testiculaire qu'il ne l'est chez les mammifères, (iii) et qu'il pourrait aussi être impliqué dans des processus spécifiques dans l'ovaire (El Jamil *et al.*, 2008). Enfin, chez les amphibiens urodèles, aucune étude n'a jamais été publiée sur Sox9.

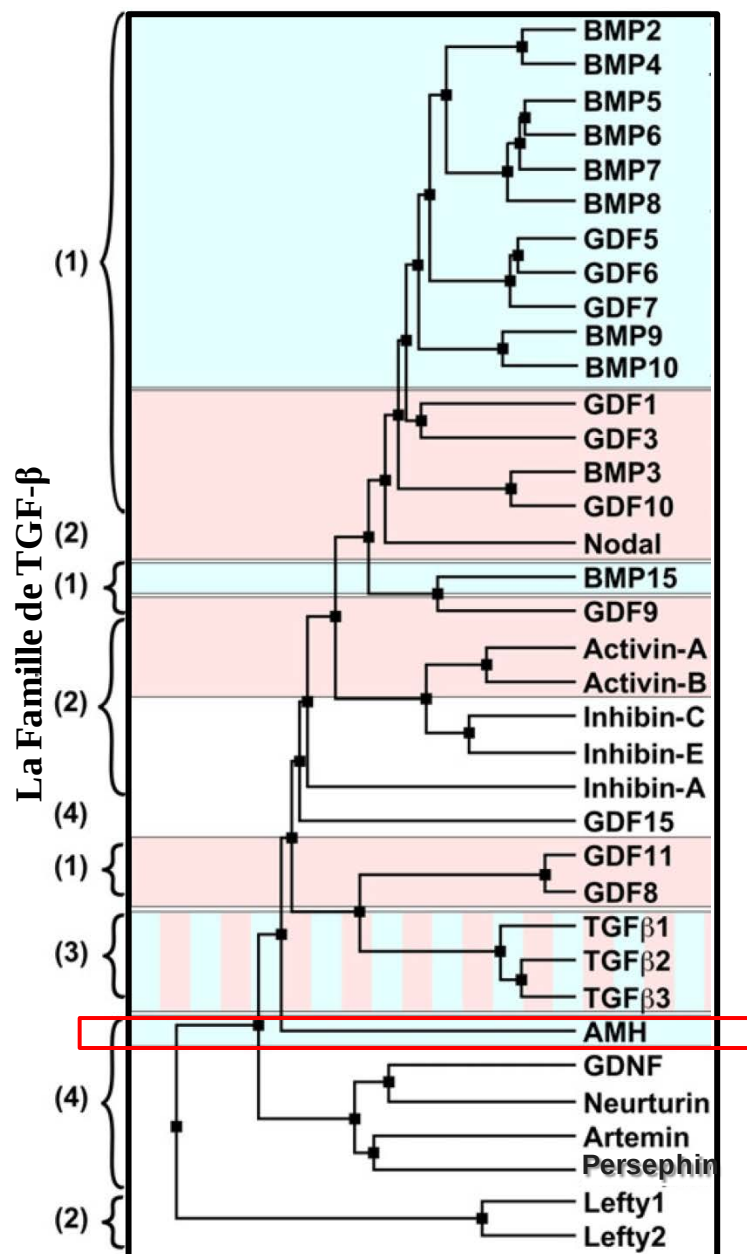


Figure 26 : Analyse phylogénétique de la superfamille du TGF-β. Cet arbre montre l'existence de quatre sous-familles indiquées sur la gauche par des numéros : (1) BMP/GDF, (2) activine/inhibine/Nodal, (3) les TGF-β et (4) autres dont l'AMH. Les cases colorées en bleu utilisent la voie SMAD 1/5/8, tandis que les cases colorées en rose utilisent la voie SMAD 2/3 (d'après Mueller & Nickel, 2012).

III) L'Hormone anti-Müllerienne (AMH)

III.1) Généralités : Définition et Découverte

L'hormone anti-Müllerienne (AMH), également connue sous le nom de Müllerian inhibiting substance ou factor (MIS/MIF), est un membre de la famille du TGF- β qui contient des facteurs impliqués dans la régulation de divers processus tels que le développement gonadique, la prolifération, la différenciation, la motilité, l'adhésion et la mort cellulaires. Cette famille comprend les protéines BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), les GDFs (*Growth Differentiation Factors*), les activines, les inhibines et les TGF- β s (Figure 26) (Massagué, 1998; Josso & di Clemente, 1999; Chang *et al.*, 2002; Massagué, 2008, 2012). L'AMH joue un rôle primordial dans le développement du système uro-génital des vertébrés au cours de la différenciation sexuelle. En effet, elle a pour rôle principal de réprimer le développement des canaux de Müller, les ébauches de l'utérus, des trompes et de la partie supérieure du vagin chez les femelles, durant la différenciation du sexe mâle (Münsterberg & Lovell-Badge, 1991). Nous devons sa découverte au professeur Alfred Jost, ayant démontré antérieurement que le testicule fœtal est indispensable à la différenciation sexuelle mâle (Jost, 1947), prouvant ensuite que la testostérone, synthétisée par le testicule fœtal, masculinise les organes génitaux externes du fœtus mais sans faire régresser les canaux de Müller (Figure 27). Il a donc émis l'hypothèse qu'un facteur testiculaire spécifique différent de la testostérone remplit cette fonction (Jost, 1953). Voilà pourquoi ce facteur a été appelé l'hormone anti-Müllérienne. L'activité biologique de cette hormone a été ensuite confirmée par un test qualitatif reposant sur sa capacité à faire régresser les canaux de Müller de fœtus de rat *in vitro* (Picon, 1969). L'AMH bovine a été purifiée en 1984 (Picard & Josso, 1984). Les gènes humains et bovins de l'*Amh* ont été isolés et séquencés en 1986 (Cate *et al.*, 1986; Picard *et al.*, 1986). Un peu plus tard, un test quantitatif fondé sur l'inhibition de l'activité aromatasase d'ovaires fœtaux a été développé par di Clemente *et al.* en 1992. Ces travaux ont été suivis par de nombreuses études révélant ses effets biologiques, ses mécanismes d'action, son expression normale et pathologique ainsi que les mécanismes impliqués dans sa régulation. Les voies de signalisation de l'AMH ont été élucidées après le clonage de son récepteur de type II (di Clemente *et al.*, 1994a; Baarends *et al.*, 1994), et l'identification du récepteur de type I (Gouédard *et al.*, 2000; Visser *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2001; Jamin *et al.*, 2002).

A l'inverse du TGF- β , produit dans la plupart des tissus, l'AMH est synthétisée exclusivement par les cellules somatiques de la gonade dans les deux sexes, à des moments bien

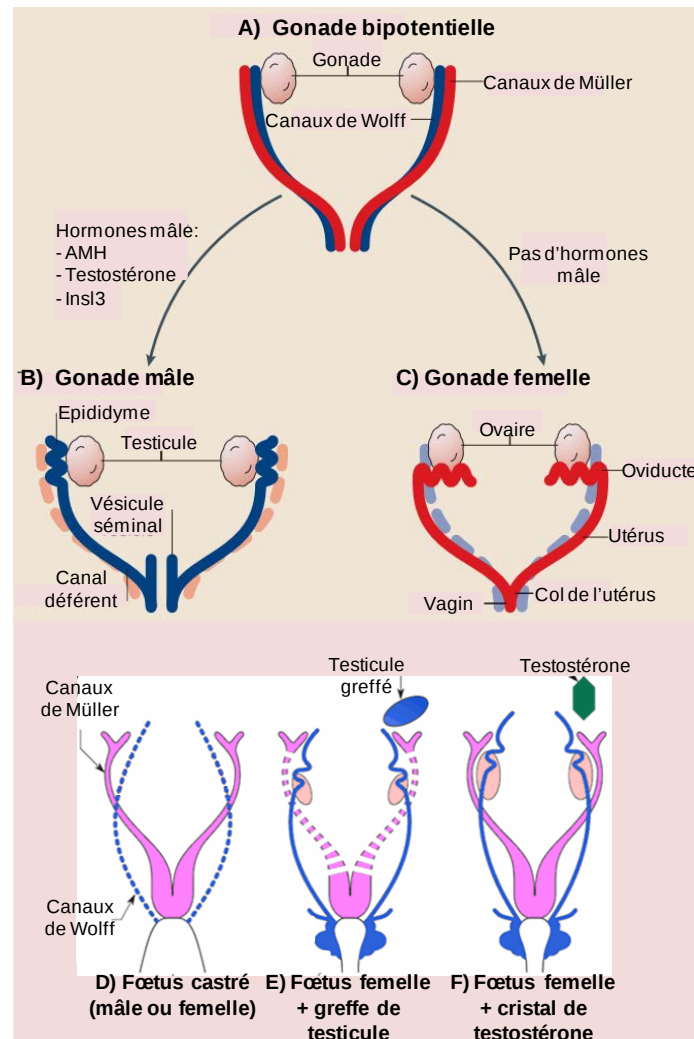


Figure 27 : Différenciation du tractus génital chez les mammifères et découverte de l'AMH.

A) Au stade indifférencié, les deux systèmes de canaux sont présents : canaux de Müller et canaux de Wolff. Les hormones produites par la gonade vont diriger la différenciation du tractus. En présence de SRY, la gonade bipotentielle devient un testicule, qui sécrète plusieurs hormones dont la testostérone, l'AMH et (*Insulin-like growth factor 3* : InsI3). **B)** Différenciation du tractus mâle : la testostérone favorise la différenciation du canal de Wolff avec formation de l'épididyme, du canal déférent et des vésicules séminales. L'AMH induit l'élimination des canaux de Müller (rose pointillé). **C)** Chez les femelles, la gonade bipotentielle devient un ovaire. En absence d'hormones mâles, le canal de Wolff dégénère (ligne pointillée bleue), tandis que le canal de Müller persiste et se différencie en donnant l'oviducte (trompe de Fallope), l'utérus, le col utérin et la partie supérieure du vagin. **D) à F)** : les expériences de Jost réalisées chez le lapin : **D)** Un fœtus castré entre 19 et 21 jpc présente des caractéristiques femelles quel que soit le sexe génétique. **E)** La greffe de testicule fœtal chez un embryon femelle conduit au développement des canaux de Wolff et à la régression des canaux de Müller. **F)** L'implantation d'un cristal de testostérone dans un embryon femelle conduit au développement des canaux de Wolff sans régression des canaux de Müller. De ces expériences, l'hypothèse de l'existence d'une hormone anti-müllérienne est née (d'après Kobayashi & Behringer, 2003; Josso, 2008).

définis (Tran & Josso, 1982; Vigier *et al.*, 1984). En effet, L'AMH est sécrétée par les cellules de Sertoli du testicule fœtal et adulte (Donahoe *et al.*, 1977; Vigier *et al.*, 1984), et par les cellules de la granulosa de l'ovaire post-natal (Hutson *et al.*, 1981; Vigier *et al.*, 1984). La production de l'AMH dans le fœtus mâle entraîne la régression des canaux de Müller. En outre, l'AMH purifiée induit *in vitro* et *in vivo* la formation des structures tubulaires analogues à des tubules séminifères dans les ovaires fœtaux, ce qui suggère que l'AMH peut influencer la différenciation testiculaire (Vigier *et al.*, 1987, 1989; Behringer *et al.*, 1990; Lyet *et al.*, 1995).

III.2) Le ligand AMH et ses effets biologiques

III.2.1) Structure moléculaire du gène et de la protéine

III.2.1.1) Le gène de l'*Amh*

Le gène ou/et l'ADNc de l'*Amh* a été cloné dans plusieurs groupes de vertébrés y compris le rat (Haqq *et al.*, 1992), la souris (Münsterberg & Lovell-Badge, 1991; King *et al.*, 1991), le poulet (Neeper *et al.*, 1996; Eusèbe *et al.*, 1996), l'alligator (Western *et al.*, 1999a; Urushitani *et al.*, 2011) et différents espèces de poissons (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Halm *et al.*, 2007; Klüver *et al.*, 2007; Pala *et al.*, 2008; Poonlaphdecha *et al.*, 2011). A ce jour, le gène n'a pas encore été cloné chez les amphibiens.

Le gène humain de l'AMH comporte 5 exons et a une taille de 2,75 kb (Cate *et al.*, 1986), il est situé sur le bras court du chromosome 19 (19p13.2–13.3) (Cohen-Haguenauer *et al.*, 1987). La fin du 5ème exon, riche en (G-C) code la partie C-terminale, biologiquement active, de la protéine, qui est la seule à présenter des homologies avec les autres membres de la famille du TGF- β (Figure 28A). L'homologie globale entre la séquence de l'AMH humaine et celles des autres espèces varie : 27% et 33% d'identité avec le poulet et l'alligator respectivement et jusqu'à 78% et 68% d'identité avec le taureau, le rat et la souris. La région 5' non traduite de l'ARNm humain est composée d'environ 10 nucléotides alors que le signal de polyadénylation contient 90 nucléotides en aval du codon-stop TGA (Cate *et al.*, 1986).

Le promoteur de l'*Amh*, localisé en amont de la région codante, a été cloné chez l'homme (Guerrier *et al.*, 1990), la souris (Dresser *et al.*, 1995), le rat (Haqq *et al.*, 1992) et le taureau. Il a été montré que le promoteur bovin de l'*Amh* contient une boîte TATA canonique à 38 pb en amont du codon ATG et un seul site d'initiation de transcription, situé à 10 pb de ce codon

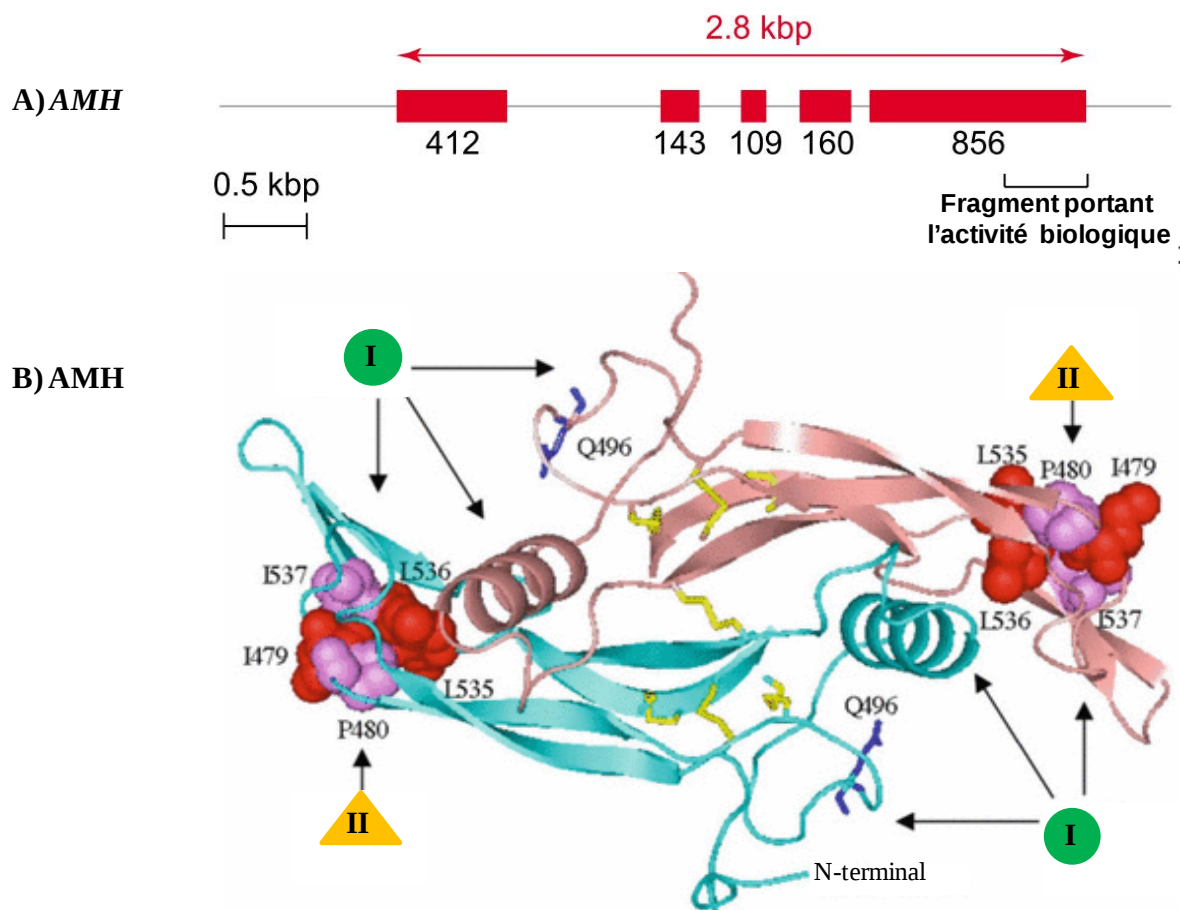


Figure 28 : Structure moléculaire du gène *AMH* et de la protéine *AMH* humaine.

A) Chez l'homme, le gène *AMH* comporte cinq exons, répartis sur 2,8 kbp. La fin du cinquième exon code pour le domaine C-terminal biologiquement actif de la protéine. **B)** Modèle tridimensionnel du domaine C-terminal dimérique de la protéine *AMH* : chacun des monomères est représenté en bleu et en rose. Les ponts disulfures sont en jaune. Le cercle vert indique la localisation de la liaison au récepteur de type I alors que le triangle orange indique la localisation du site de liaison au récepteur de type II (d'après Josso & di Clemente, 2003; Josso, 2011).

(Cate *et al.*, 1986). En plus, les promoteurs de la souris et du rat contiennent une boîte TATA parfaite, tandis que le promoteur humain n'a pas les motifs consensus ; ni la boîte TATA ni la boîte CCAAT.

Le clonage de 3,6 kb de la région 5' du gène de l'*AMH* humain a permis d'identifier un site majeur d'initiation de la transcription et trois autres sites mineurs, ainsi qu'un élément putatif de réponse aux œstrogènes (ERE : *Estrogen-Response Element*) à -1772 pb et un site de liaison à Sp1 (*Specificity Protein 1*) à -303 pb (Guerrier *et al.*, 1990). Un gène « de ménage », récemment identifiée, appelé *SAP62/SF3A2*, codant une protéine intervenant dans l'épissage, est localisé à -679 pb du site d'initiation de la transcription du gène de l'*AMH* chez l'homme et à -328 pb chez la souris (Dresser *et al.*, 1995; Beau *et al.*, 2001). De nombreuses études ont révélé des régions régulatrices dans le promoteur minimal de 400 pb du gène de l'*AMH* chez l'homme et la souris en montrant des sites de liaison pour les facteurs GATA, SF1 et SOX9 (Voir partie régulation de l'*Amh*).

III.2.1.2) La protéine AMH

L'*AMH*, est une glycoprotéine. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur de 560 aa chez l'homme contenant un peptide leader de 25 aa dont les premiers 17 ou 18 aa constituent le peptide signal, alors que les 7 ou 8 aa restants peuvent être la « pro-séquence ». L'*AMH* forme des homodimères de 70 kDa stabilisés par deux ponts disulfures (Figure 28B). Son activation nécessite un clivage protéolytique libérant un fragment N-terminal (pro-région) inactif de 110 kDa et un fragment C-terminal plus court, de 25 kDa, portant l'activité biologique de la molécule et présentant le domaine mature (Figure 29). Après ce clivage, les deux fragments demeurent associés par des liaisons non-covalentes dont la rupture entraîne la dissociation de ces fragments. Cette dissociation est indispensable à la liaison du TGF- β à son récepteur de type II, mais il n'en est pas de même pour l'*AMH*. En effet, Nathalie di Clemente et ses collègues ont montré que la molécule clivée est capable de se lier à son récepteur, AMHR-II entraînant secondairement la dissociation complète des fragments (di Clemente *et al.*, 2010). Ce mécanisme d'action est semblable à celui des protéines BMPs, avec lesquelles l'*AMH* partage des facteurs de signalisation, récepteurs et protéines effectrices Smad. L'alignement des séquences peptidiques de l'*AMH* de plusieurs vertébrés a permis à déterminer le site monobasique du clivage entre les deux domaines : il est composé de quelques aa de séquence type (R/K-XX-R/K). Par ailleurs, le site cellulaire où se produit le clivage protéolytique de la protéine est controversé. En effet, pour certains chercheurs, le

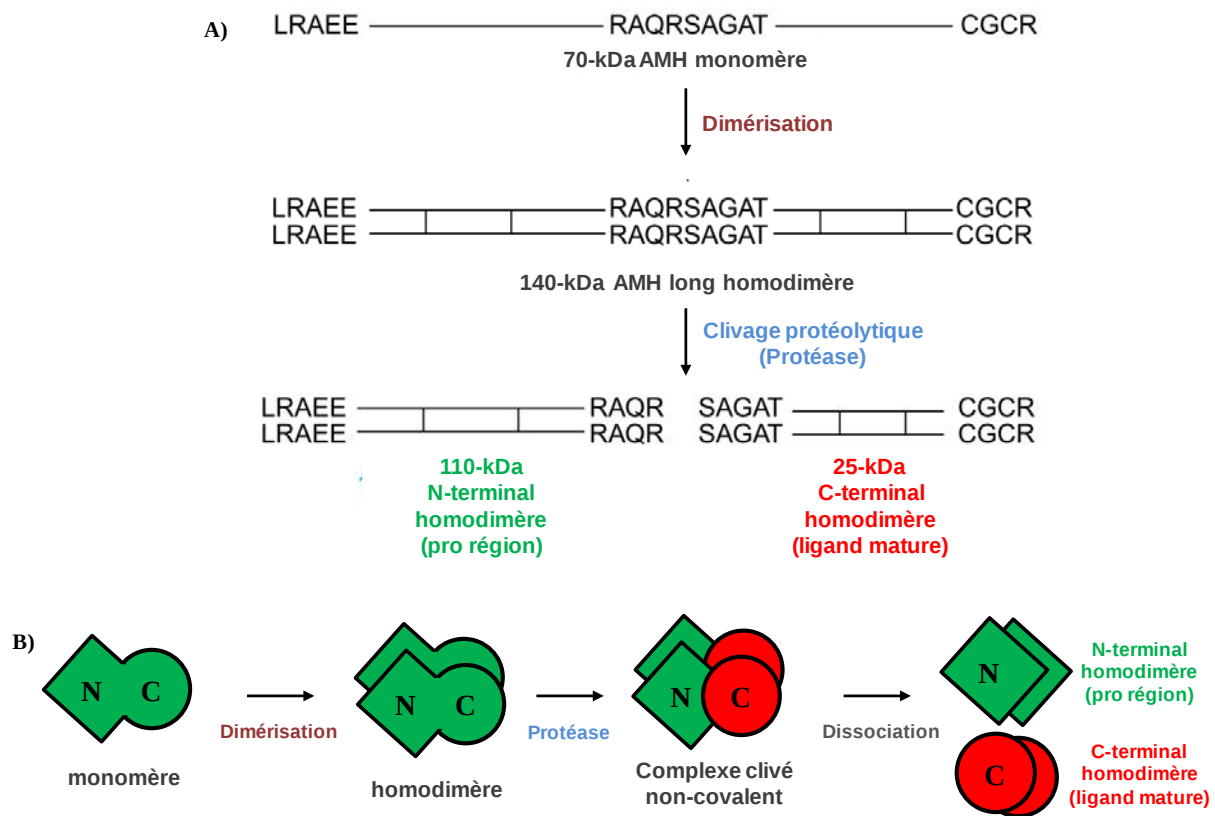


Figure 29 : Schéma résumant le processus nécessaire à l'activation de la protéine AMH.

A) Monomère de l'AMH mature de 70 kD. Deux monomères s'associent en dimères par des ponts disulfures. L'activation de l'AMH longue homodimère de 140 kDa nécessite un clivage protéolytique libérant un fragment N-terminal (pro-région) inactif de 110 kDa et un fragment C-terminal de 25 kDa portant l'activité biologique de la molécule et représentant le domaine mature. **B)** Pour les membres de la famille du TGF- β , après le clivage, les fragments (N et C-terminaux) demeurent associés par des liaisons non-covalentes dont la rupture entraîne la dissociation. Cette dissociation est indispensable à la liaison du TGF- β à son récepteur de type II, mais il n'en est pas de même pour l'AMH, car il a été montré que la molécule clivée est capable de se lier à son récepteur, AMHR-II entraînant secondairement la dissociation complète des fragments (d'après Josso & di Clemente, 2003; di Clemente *et al.*, 2010).

clivage a lieu avant la sécrétion par la cellule productrice (cellule somatique de gonade) (Nachtigal & Ingraham, 1996), alors que pour d'autres dans la mesure où l'AMH purifiée non clivée est biologiquement active, il est évident que le clivage s'effectue aussi dans les organes-cibles (Rey *et al.*, 2003). Contrairement aux autres protéines de la famille du TGF- β , le domaine N-terminal de l'AMH potentialise et maintient l'activité biologique du fragment C-terminal (Wilson *et al.*, 1993). Ainsi, des mutations dans le domaine N-terminal pourraient affecter soit la biosynthèse soit l'activité de l'AMH (Belville *et al.*, 2004).

III.2.2) Régulation de l'expression de l'*Amh*

III.2.2.1) Régulation moléculaire de l'*Amh*

La régulation de l'expression de l'*Amh* dans les gonades est assez bien décrite et l'activité fonctionnelle des séquences proximales du promoteur a été bien étudiée (Figure 30). Plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la détermination du sexe (SF1, WT1, SOX9, et GATA4) sont aussi connus comme étant des régulateurs importants de l'expression de l'*Amh*. Chez la souris, les premières 180 pb du promoteur sont suffisantes pour l'expression spécifique de l'*Amh* dans les cellules de Sertoli *in vitro* et *in vivo* (Shen *et al.*, 1994; Giuli *et al.*, 1997). Le premier facteur crucial pour l'expression de l'*Amh* est SF1. En effet, la protéine SF1 active la transcription de l'*Amh* à la fois *in vivo* (Giuli *et al.*, 1997) et *in vitro* (de Santa Barbara *et al.*, 1998a). En effet, l'analyse du promoteur *in vitro* a révélé un site de liaison pour la protéine SF1 comportant (AGGTCA) à -92 pb du site d'initiation de la transcription et la mutation de ce site (AMH-RE1 : ATTTCA), abolit la liaison de SF1 et donc abolit l'expression de l'*Amh* (Shen *et al.*, 1994). Chez des souris transgéniques, il a été montré que ce site de liaison à SF1 est nécessaire pour l'expression sexe-spécifique de l'*Amh* (Giuli *et al.*, 1997). En plus, *in vitro* la mutation appelée AMH-RE1 dans le site de SF1 entraîne une forte diminution de l'activité transcriptionnelle de l'*Amh* et empêche la régression des canaux de Müller (Shen *et al.*, 1994), alors que seule une légère diminution d'expression d'*Amh* qui n'affecte pas les canaux de Müller a été observée *in vivo* chez des souris transgéniques ayant cette mutation suite à une recombinaison homologue (Arango *et al.*, 1999). Ultérieurement, il a été montré que la région entre -269 pb et -192 pb est nécessaire pour l'activité complète du promoteur car elle contient une séquence similaire à la séquence consensus du site de liaison à SF1, CTCAAGGACAG, à -218 pb du site d'initiation de la transcription et qui est conservée entre le rat, la souris, le taureau et l'homme (Watanabe *et al.*, 2000).

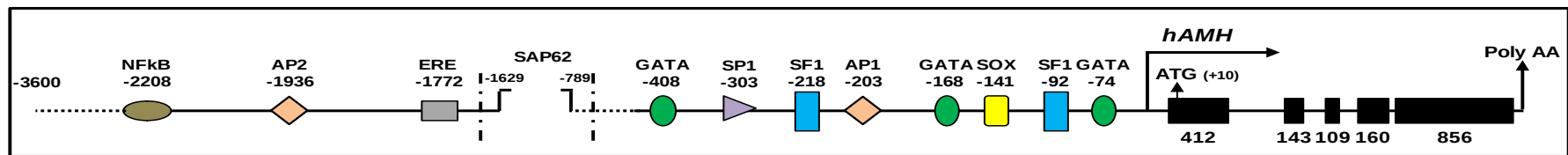


Figure 30 : Représentation schématique des sites responsables de la régulation moléculaire dans le promoteur humain de l'AMH.

Localisation des sites de liaison pour SF1, GATA4, SP1 et SOX ; les positions nucléotidiques sont conformes à la séquence publiée par Guerrier *et al.*, 1990. La localisation du gène SAP62 humain est déterminée selon Dresser *et al.*, 1995. Les sites pour NFkB et AP2 sont déterminés selon Lukas-Croisier *et al.*, 2003. Le site AP1 a été identifié par Taieb *et al.*, 2011. Le site ERE a été identifié par Grynberg *et al.*, 2012.

Un autre élément de réponse spécifique à SOX9, situé à seulement 141 pb en amont du site d'initiation de la transcription est essentiel pour l'initiation de l'expression de l'AMH testiculaire fœtale (da Silva *et al.*, 1996; de Santa Barbara *et al.*, 1998a; Arango *et al.*, 1999). Des mutations au niveau de ce site de liaison dans le promoteur de l'*Amh* entraînent des cas de pseudohermaphrodisme (Arango *et al.*, 1999). En effet, SOX9 et la protéine SF1 coopèrent pour réguler l'expression de l'*Amh*. SOX9 et SF1 interagissent directement *via* le domaine de liaison à l'ADN de SOX9 et la région C-terminale de SF1. Récemment, un autre gène de la famille SOX, SOX8, dont l'expression commence juste avant celle de l'AMH dans les gonades mâles de souris, a été étudié. La protéine SOX8 peut se lier sur les sites de liaison SOX dans le promoteur proximal de l'*Amh* et comme SOX9, peut interagir avec la protéine SF1. Ainsi, SOX8 pourrait se substituer à la protéine SOX9 quand cette dernière est exprimée trop tard (Schepers *et al.*, 2002).

Trois sites GATA sont également présents à -75 pb, -168 pb et -408 pb. Il a été prouvé que GATA4 peut activer la transcription par deux façons : soit par une liaison directe sur ses éléments de réponse (Viger *et al.*, 1998), soit en coopérant avec SF1 (Tremblay & Viger, 1999). Par ailleurs, FOG1 (*Freinds of GATA*) et FOG2 peuvent moduler négativement l'expression de l'*Amh* en réprimant la capacité trans-activatrice des facteurs GATA par interaction protéine-protéine (Robert *et al.*, 2002). En outre, deux autres facteurs nucléaires peuvent également moduler l'activité du promoteur proximal d'*Amh* sans se lier à l'ADN ; WT1 qui agit en synergie avec SF1 afin d'améliorer l'activité transcriptionnelle de l'*Amh*, et DAX1 qui agit en antagonisant les liaisons protéine-protéine entre WT1 et SF1 (Nachtigal *et al.*, 1998) ou entre GATA4 et SF1 (Tremblay & Viger, 2001). Récemment, il a été montré que dans la lignée sertolienne, SMAT1, l'AMP cyclique (AMPC) régule positivement l'expression de SOX9, SF1 et GATA4. Il induit la translocation nucléaire de SOX9 et SF1 principalement par le biais de la PKA (*protein kinase A*), et la liaison à leurs éléments de réponse sur le promoteur de l'*Amh* résultant en une augmentation de l'expression (Lasala *et al.*, 2011).

En plus du gène « de ménage », *SAP62*, précédemment mentionné, situé à -679 pb du site d'initiation de la transcription chez l'homme, l'analyse détaillée des séquences promotrices distales entre -1921 pb et -3068 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène de l'AMH humain, a révélé l'existence d'un site de liaison consensus pour le facteur nucléaire- κ B (NF κ B) à -2208 pb et un autre site consensus pour AP2 (*Activating Protein 2*) à -1936 pb. Les mutations des sites de NF κ B et/ou AP2 n'affectent pas l'activité basale du promoteur, mais elles entraînent une forte diminution de la réponse à l'AMPC. Par ailleurs, la

surexpression de NFκB et/ou AP2 améliore l'activité du promoteur (Lukas-Croisier *et al.*, 2003). Enfin, un site consensus pour AP1 a été également identifié à -203 pb dont la mutation conduit à une augmentation de l'activité promotrice basale, suggérant qu'AP1 est un inhibiteur du promoteur basal (Taieb *et al.*, 2011). Enfin, il a été démontré que l'E₂ a un effet sur la transcription de l'*Amh* soit en l'inhibant par l'isoforme ERβ, soit en l'activant par ERα. Cet effet inhibiteur ou activateur se produit après la liaison de ces isoformes sur leur site ERE à -1772 pb ou sur les sites de SF1 qui ressemblent fortement à ERE (Grynberg *et al.*, 2012).

III.2.2.2) Régulation hormonale de l'AMH

III.2.2.2.1) Régulation par les androgènes

Chez le mâle, au cours de la puberté, l'AMH sérique et les taux de testostérone montrent une corrélation inverse significative : lorsque l'AMH sérique diminue progressivement, les niveaux de testostérone augmentent. Des observations cliniques suggèrent qu'à la puberté, la production d'AMH est inhibée par les androgènes. En fait, il a été montré que l'absence des androgènes dans les gonades conduit à un aspect immature des cellules de Sertoli, avec une expression élevée d'AMH, ainsi qu'une spermatogenèse incomplète chez les patients atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope congénital (Iovane *et al.*, 2004), ou d'insensibilité aux androgènes à cause de mutations au niveau de leur récepteur AR (Quigley *et al.*, 1995). Récemment, il a été montré chez les enfants ayant une puberté précoce à l'âge de 11 mois, que l'expression de l'AMH n'est pas diminuée malgré l'augmentation de la concentration de la testostérone (Bergadá *et al.*, 2006). Ce qui indique que la sécrétion d'androgènes, anormalement élevée par rapport à l'âge, entraîne des signes du développement pubertaire, comme l'augmentation de la taille du pénis, mais est incapable d'induire la maturation des cellules de Sertoli, empêchant donc l'inhibition de l'AMH. De même, chez des enfants atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope, un traitement prolongé par la « *Human Chorionic Gonadotropine* (hCG) induit la sécrétion d'androgènes par les cellules de Leydig à des niveaux élevés, sans inhiber la sécrétion d'AMH (Bougnères *et al.*, 2008). Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré, dans la lignée des cellules de Sertoli pré-pubères des souris invalidées pour l'AR, des niveaux élevés d'expression de l'AMH malgré la forte concentration d'androgènes locale dans le milieu de culture. Pourtant, l'expression de l'AMH est significativement inhibée lorsque cette lignée cellulaire est transfectée avec un vecteur exprimant l'AR et incubée avec un milieu contenant des androgènes (Boukari *et al.*, 2007). Il

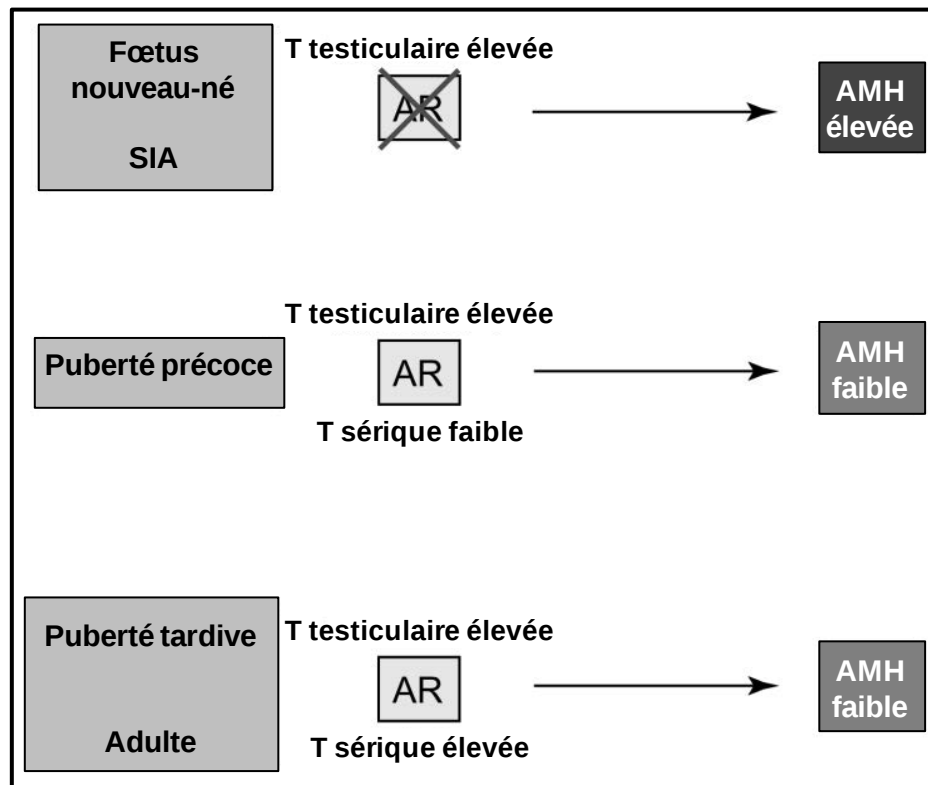


Figure 31 : Régulation de la sécrétion de l'AMH par les androgènes. Chez le fœtus et le nouveau-né, une forte concentration de la testostérone intra-testiculaire (T) n'est pas capable d'inhiber la production d'AMH car le récepteur des androgènes (AR) n'est pas exprimé dans les cellules de Sertoli. La même situation s'applique aux syndromes d'insensibilité aux androgènes (SIA). Pendant la puberté précoce, la T atteint une forte concentration dans les testicules, mais elle n'est pas encore présente dans le sérum. Elle inhibe l'AMH car l'AR est présent dans les cellules de Sertoli. À la fin de la puberté et à l'âge adulte, les niveaux élevés de T intra-testiculaire et de T sérique sont corrélés à un niveau faible d'AMH sérique (d'après Rey, 1998).

est intéressant de noter que chez *Macropus eugenii*, l'expression de l'AMH diminue en réponse aux androgènes au moment de l'initiation de la masculinisation uro-génitale, et pas comme l'homme au moment de la puberté. Cette différence pourrait s'expliquer par l'expression de l'AR dans les cellules de Sertoli au moment de la virilisation des organes reproducteurs chez les mâles (Racine *et al.*, 2009).

En résumé, l'absence de l'expression d'AR dans les cellules de Sertoli pendant la vie fœtale, néonatale et infantile peut protéger ces cellules d'une maturation précoce. Au moment de la puberté, la testostérone intra-testiculaire augmente et agit sur les cellules de Sertoli ayant une expression élevée d'AR, ce qui entraîne la maturation des cellules de Sertoli, la régulation négative de l'expression de l'AMH et le début de la spermatogenèse complète (Rey *et al.*, 2009) (Figure 31).

III.2.2.2.2) Régulation par les gonadotrophines

Les gonadotrophines pourraient jouer un rôle en stimulant la production testiculaire d'AMH. En effet, chez les patients atteints d'une sécrétion anormale d'androgènes, l'AMH sérique est anormalement élevée uniquement pendant la période néonatale et pubertaire, ce qui coïncide avec l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, mais l'AMH reste à des niveaux normaux pendant l'enfance (Rey *et al.*, 1994). En outre, chez des souris pré-pubères Tfm (*testicular feminized mouse*) insensibles aux androgènes, l'administration de la FSH (*Follicle-stimulating hormone*) entraîne une augmentation des taux d'AMH, indiquant que la sécrétion d'AMH est stimulée par la FSH en l'absence de l'effet négatif des androgènes (Al-Attar *et al.*, 1997). Chez les rats mâles pré-pubères, l'expression de l'AMH coïncide avec l'activité mitotique des cellules de Sertoli (Hirobe *et al.*, 1992), qui est sous le contrôle de la FSH (Griswold *et al.*, 1977; Orth, 1984). De plus, le niveau d'ARNm de l'AMH augmente dans des cultures de testicules fœtaux humains après l'ajout d'AMPc, un des messagers essentiels impliqués dans la signalisation de la FSH (Voutilainen & Miller, 1987). Par ailleurs, l'administration de FSH recombinante à des souris normales pré-pubères conduit à une augmentation significative de l'AMH sérique, ce qui prouve définitivement l'action de la FSH sur la production testiculaire de l'AMH (Al-Attar *et al.*, 1997). Récemment, il a été montré que suite à l'activation de la cascade de signalisation classique de la FSH dans les cellules de Sertoli pré-pubères, une augmentation de la concentration d'AMPc active la voie de signalisation de la PKA qui est capable d'élever l'expression de l'AMH soit en induisant AP2 et NFκB à se lier à leurs éléments de réponse dans le promoteur distal d'AMH (Lukas-

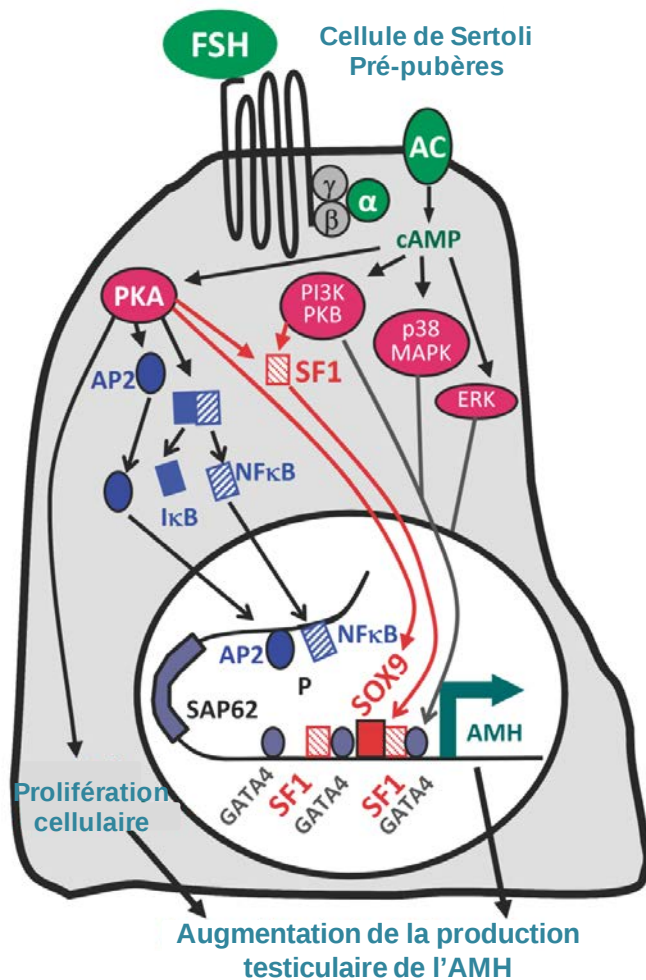


Figure 32 : Augmentation de la production testiculaire d'AMH suite à une stimulation par la FSH. Dans les conditions basales, soit dans la vie fœtale, lorsque les gonadotropines ne sont pas encore actives et pendant la vie infantile, l'expression d'AMH dépend de la trans-activation potentielle des facteurs SOX9, SF1 et GATA4. La FSH se lie à son récepteur couplé aux protéines G. La sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique active l'adénylcyclase (AC) provoquant une augmentation de la concentration de l'AMPc qui peut activer plusieurs kinases comme PKA, PI3K-PKB, p38 MAPK et MEK1/2-ERK1/2. La PKA induit une augmentation l'expression de l'AMH en induisant AP2 et NFκB à se lier à leurs éléments de réponse dans le promoteur distal de l'AMH. La PKA est également impliquée dans l'activation de SOX9 et SF1 ainsi que la translocation nucléaire de SF1, résultant en l'augmentation de l'expression de l'AMH. En outre, PI3K-PKB, p38 MAPK et MEK1/2-ERK1/2 peuvent également médier l'activation de l'expression de l'AMH dépendante de la FSH en augmentant la disponibilité de SF1 et GATA4 dans le noyau des cellules de Sertoli, mais ces voies ne semblent pas indispensables. Enfin, l'activité PKA dépendante de la FSH est également connue pour induire la prolifération cellulaire (d'après Lasala *et al.*, 2011).

Croisier *et al.*, 2003), soit en permettant à SOX9 et SF1 de s'activer et se lier à leurs sites dans le promoteur proximal d'AMH (Figure 32) (Lasala *et al.*, 2011). De même, dans les cellules de la granulosa, la FSH et l'AMPc activent le promoteur d'*Amh* par une voie de signalisation dépendante de PKA/p38 (Taieb *et al.*, 2011).

III.2.2.3) Régulation de l'AMH par les cellules germinales

L'expression de l'AMH s'éteint dans les cellules de Sertoli à la période où la spermatogenèse entre dans la phase méiotique (Münsterberg & Lovell-Badge, 1991; Hirobe *et al.*, 1992). En outre, la diminution de la production d'AMH peut être observée clairement dans le testicule pubère, car tous les tubules séminifères déjà entrés en méiose n'expriment plus l'AMH, tandis que les tubules voisins pré-méiotiques synthétisent encore cette hormone (Figure 33). Ainsi, au cours du développement pubertaire, la chute progressive de l'AMH sérique est le résultat de la diminution de l'AMH dans chaque tubule séminifère qui entre en méiose (Rey *et al.*, 1996a; Al-Attar *et al.*, 1997).

La souris XXSxr^b (*sex-reversad XX male mouse*) est un bon modèle pour étudier le rôle des CG dans la régulation négative de l'AMH. En effet, c'est un modèle naturel d'inversion masculinisante résultant de la translocation d'un petit fragment du chromosome Y, contenant Sry, sur un chromosome X. Ces souris développent des testicules ayant une fonction androgénique normale, mais la présence de deux chromosomes X entraîne une dégénérescence des CG avant l'entrée en méiose (Cattanach *et al.*, 1982). Bien que le niveau de l'ARNm et de la protéine AMH diminue dans les cellules de Sertoli à la fois chez les souris mâles pré-pubères XXSxr^b et normales XY, ce niveau reste significativement plus élevé dans les testicules de souris XXSxr^b pubères (Al-Attar *et al.*, 1997). Ainsi, les androgènes sont capables d'inhiber partiellement l'expression de l'AMH d'une façon indépendante de l'entrée méiotique pendant la puberté, mais une action synergique de la testostérone avec les CG méiotiques est nécessaire afin d'inhiber complètement la production de l'AMH. Malgré la persistance de l'expression de l'AMH dans les testicules des souris XXSxr^b pubères, les taux d'AMH sériques ne sont pas significativement plus élevés que ceux observés chez les témoins. Cette contradiction apparente entre les taux indétectables de l'AMH sérique et la persistance de l'expression testiculaire d'AMH peut être expliquée par une sécrétion directionnelle de l'AMH vers la lumière tubulaire qui est susceptible de se produire après le développement des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli. En fait, les cellules de Sertoli des souris XXSxr^b montrent des changements morphologiques dans leur

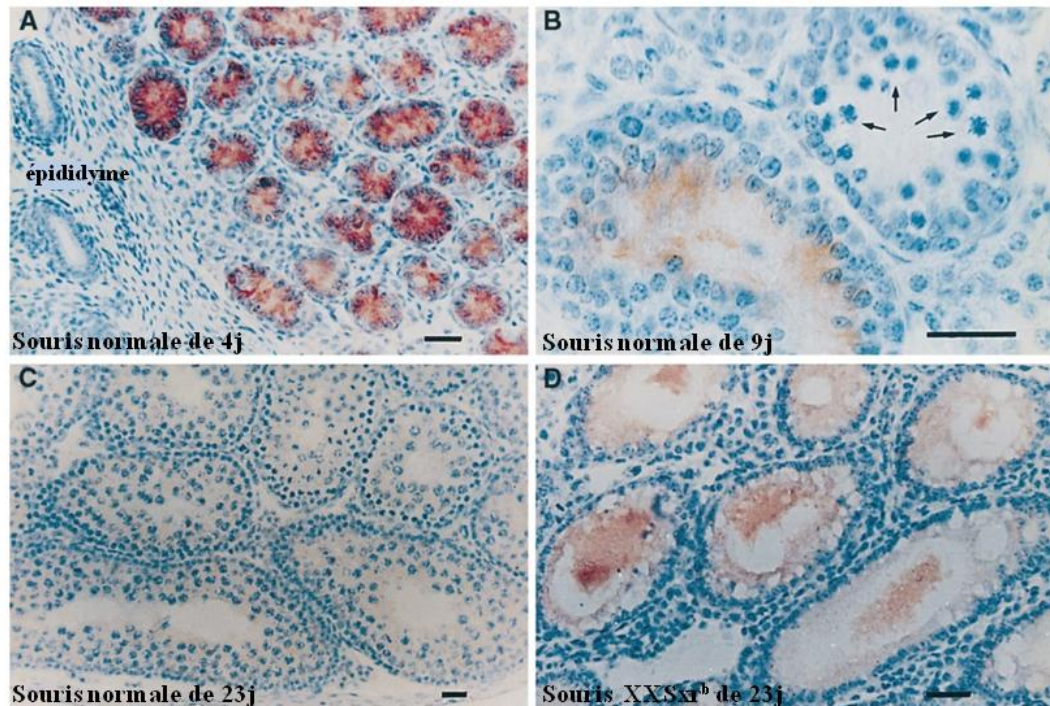


Figure 33 : Immunohistochimie montrant la diminution de la production d'AMH dans le testicule pubère. A) Souris pré-pubertaire de 4 jours : tous les tubes séminifères sont positifs pour l'AMH, les cellules épithéliales de l'épididyme sont négatives, ce qui montre la spécificité du marquage. **B)** Souris en début de puberté (9 jours) : un tube séminifère pré-méiotique exprime encore l'AMH à de faibles niveaux, tandis qu'un tube voisin avec spermatocytes en méiose (flèches) ne montre plus d'immuno-réactivité contre l'AMH. **C)** Souris en fin de puberté (23 jours) : les tubules ont atteint un stade avancé dans la spermatogenèse et sont tous négatifs pour l'AMH. **D)** Souris $XXSxr^b$ (23 jours) : l'AMH peut être détectée dans les cellules de Sertoli et la lumière de tous les tubes séminifères, qui sont appauvris en CG. Noter l'existence d'une lumière tubulaire ayant un diamètre similaire à celui observé chez la souris contrôle au même âge, indiquant la maturation pubertaire des cellules de Sertoli. Barres = 50 μm (d'après Rey, 1998).

noyau et cytoplasme typiques de la maturation pubertaire, grâce à une action efficace des androgènes.

III.2.3) Expression de l'AMH

III.2.3.1) L'AMH dans le testicule

III.2.3.1.1) Dans le testicule fœtal

L'AMH, comme son nom l'indique, a une fonction précise au cours de la différenciation sexuelle fœtale : la régression des canaux de Müller. Le phénotype résultant de mutations de l'AMH ou de son récepteur chez l'homme, conduit au syndrome de persistance des canaux de Müller (Belville *et al.*, 1999). L'utilisation de souris transgéniques, surexprimant ou invalidées pour l'*Amh* ou l'*Amhr-II* (Behringer *et al.*, 1990; 1994; Mishina *et al.*, 1996) peut montrer l'effet de cette hormone. Pendant la vie fœtale dans les deux sexes, les canaux de Müller sont présents et le récepteur spécifique de l'AMH est exprimé au moment où la différenciation sexuelle est déclenchée. Par conséquent, la production d'AMH par les testicules est responsable de l'initiation de la régression des canaux de Müller chez le fœtus mâle. En fait, l'AMH est l'une des premières protéines spécifiques des cellules de Sertoli exprimée par la gonade (Tran *et al.*, 1977). Dès que les cordons testiculaires commencent à s'assembler dans la gonade fœtale (Tilman & Capel, 2002), l'expression de l'AMH est déclenchée lors de la différenciation des cellules de Sertoli.

En utilisant des anticorps spécifiques, la protéine AMH a été détectée exclusivement dans le cytoplasme des cellules de Sertoli, plus précisément dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Tran & Josso, 1982; Hayashi *et al.*, 1984). L'AMH est sécrétée par les testicules humains à partir de la 6^{ème} semaine de grossesse et provoque la régression irréversible du canal de Müller, qui sera achevée à la fin de la 9^{ème} semaine (Taguchi *et al.*, 1984). Chez les rongeurs, les canaux de Müller sont sensibles à l'AMH vers 13,5-14 jpc; et la régression a lieu entre les 16 et 20 jpc. À la fin de cette période, le canal de Müller n'est plus susceptible d'effectuer la régression induite par l'AMH (Orvis & Behringer, 2007). Pourtant, l'expression d'AMH par les cellules de Sertoli reste à des niveaux élevés au cours de la vie fœtale et prépubère, ce qui indique que la fin de la période critique de la régression müllérienne dépend plutôt du profil d'expression du récepteur de type II de l'AMH (Josso *et al.*, 2001) et des caractères cellulaires du canal de Müller (Orvis & Behringer, 2007).

III.2.3.1.2) Dans le testicule postnatal

L'AMH testiculaire est maintenue à des niveaux élevés jusqu'à la puberté, où la maturation des cellules de Sertoli nécessite une diminution d'activité de l'AMH chez plusieurs espèces (Vigier *et al.*, 1983; Münsterberg & Lovell-Badge, 1991; Rey *et al.*, 1996; Rajpert-De Meyts *et al.*, 1999; Rota *et al.*, 2002). Au cours du développement pubertaire, l'inhibition de la synthèse de l'AMH coïncide avec l'entrée en méiose des spermatocytes (Rey *et al.*, 1996a; Al-Attar *et al.*, 1997; Rajpert-De Meyts *et al.*, 1999), où la barrière hémato-testiculaire se développe grâce à des jonctions serrées établies entre les cellules de Sertoli, permettant à l'AMH de passer directement vers la lumière des tubes séminifères (Josso *et al.*, 1979; Vigier *et al.*, 1983; Fallat *et al.*, 1996; Fénichel *et al.*, 1999; Fujisawa *et al.*, 2002).

III.2.3.2) L'AMH dans l'ovaire

Dans l'ovaire, les cellules de la granulosa, homologues des cellules de Sertoli dans le testicule, produisent également de l'AMH (Vigier *et al.*, 1984). L'expression de l'AMH dans l'ovaire ne commence qu'à partir de la période périnatale (Bézar *et al.*, 1987; Ueno *et al.*, 1989; Rajpert-De Meyts *et al.*, 1999). Puis, elle reste faible tout au long de la vie reproductive de la femme et devient indétectable après la ménopause (Rey *et al.*, 1996b; Lee *et al.*, 1996). La production de l'AMH dans les cellules de la granulosa des follicules primaires ayant des petites cavités est homogène, alors que dans les grands follicules, l'AMH est principalement produite par les cellules situées près de l'ovocyte et les cellules entourant l'antrum (Ueno *et al.*, 1989; Münsterberg & Lovell-Badge, 1991; Hirobe *et al.*, 1994; Baarends *et al.*, 1995b; Rajpert-De Meyts *et al.*, 1999; Rey *et al.*, 2000). Chez le rongeurs, il a été montré que l'AMH est exprimée à partir de 6^{ème} jour post-partum (jpp) par les cellules de la granulosa des follicules pré-antraux et des petits follicules antraux chez la souris, et à partir de 3 jpp dans les cellules de la granulosa des follicules primaires chez la ratte (Hirobe *et al.*, 1994). Lorsque l'ovocyte achève la première division méiotique et devient un ovocyte II, l'AMH n'est plus détectable chez la souris (Münsterberg & Lovell-Badge, 1991).

III.2.4) Les modèles transgéniques et les Knock-out de l'Amh

La surexpression de l'AMH chez des souris femelles entraîne la régression des canaux de Müller. En effet, des souris transgéniques exprimant l'AMH humaine de façon continue sous le contrôle du promoteur de la métallothionéine (MT-hAMH) ont été générées. Cette expression chronique chez les femelles induit l'inhibition de la différenciation des canaux de

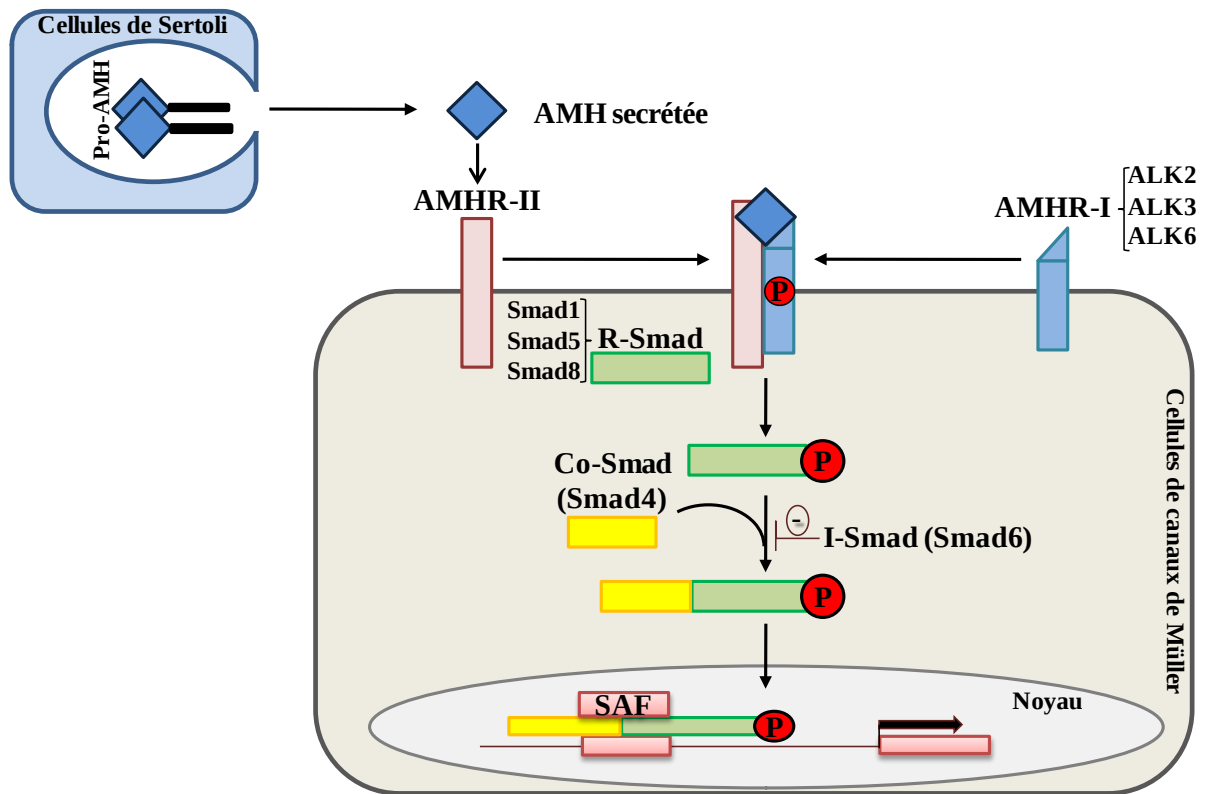


Figure 34 : Mode d'action de l'AMH. Après la sécrétion de l'AMH par les cellules de Sertoli, la liaison à son récepteur de type II, AMHR-II, dans les cellules cibles telles que les cellules des canaux de Müller, déclenche probablement le recrutement et la phosphorylation d'un ou plusieurs récepteurs de type I, ALK2, 3 et 6. Ces dernières phosphorylent à leur tour les molécules Smad 1, 5 ou 8, R-Smad qui se lie ensuite à Smad4, Co-Smad. Le complexe pénètre alors dans le noyau et se lie aux facteurs de transcription SAF (*Smad-Associated Factors*) afin d'activer ou inhiber des gènes cibles potentiels. Smad6 inhibe cette voie (d'après Josso & di Clemente, 2003).

Müller en donnant un vagin fermé dans sa partie intérieure sans trompes de Fallope, sans utérus et sans oviducte (Behringer *et al.*, 1990; Behringer, 1995). Ces souris possèdent d'autres anomalies telles que la perte de CG dans les ovaires ainsi que la réorganisation des cellules somatiques dans des structures tubulaires analogues à des tubules séminifères chez l'adulte. Par ailleurs, lorsque la gonade fœtale XX a été greffée de façon ectopique, quelques cordons testiculaires composés de cellules somatiques exprimant l'AMH sont apparus tôt par rapport à l'appariation normale dans l'ovaire. Cette transplantation ectopique de gonades fœtales est corrélée avec la perte des CG. Une augmentation de l'expression d'AMH a été révélée par l'immunomarquage de ces cordons, indiquant que les CG contrôlent la régulation de l'expression d'AMH (Taketo *et al.*, 1993). Cette expression dans les ovaires a affecté d'autres phénomènes comme la folliculogénèse, l'activité de l'aromatase et la méiose (Lyet *et al.*, 1995).

Chez le mâle, la surexpression de l'AMH induit une féminisation des organes génitaux externes, une altération du développement des canaux de Wolff, ainsi que la cryptorchidie testiculaire (Behringer *et al.*, 1990). En plus, il a été montré que cette surexpression de l'AMH bloque la différenciation des précurseurs de cellules de Leydig et leur fonction stéroïdogène conduisant à une hypoplasie de ces cellules (Behringer *et al.*, 1990; Racine *et al.*, 1998). Les études de délétion de l'*Amh* (Behringer *et al.*, 1994) et de son récepteur *Amhr-II* (Mishina *et al.*, 1996) chez des souris mâles confirment son implication dans la régression des canaux de Müller. En effet, ces mutations conduisent au développement de pseudo-hermaphrodites avec rétention des canaux de Müller. En plus, ces souris possèdent une hyperplasie des cellules de Leydig (Behringer *et al.*, 1994; Behringer, 1995; Mishina *et al.*, 1996). La spécificité de l'AMHR-II pour son ligand a été également démontrée par la génération combinée de souris femelles surexprimant l'*Amh* et invalidées pour l'*Amhr-II*. Ces femelles sont fertiles avec des canaux de Müller normaux malgré les niveaux très élevés de l'*Amh* (Mishina *et al.*, 1999).

III.3) Les récepteurs de l'AMH

III.3.1) La voie de transduction de la famille du TGF- β

Les membres de la famille du TGF- β transduisent leur signal par l'intermédiaire de deux types de récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase de type I et II. Deux protéines cytoplasmiques effectrices, partagées avec la signalisation des protéines BMPs, les Smads (*Sma-* and *Mad-related protein*) spécifiques (R-Smad) et une Smad commune à tous les ligands, Smad4 (Massagué *et al.*, 2005). Une fois l'AMH fixée à son récepteur AMHR-II,

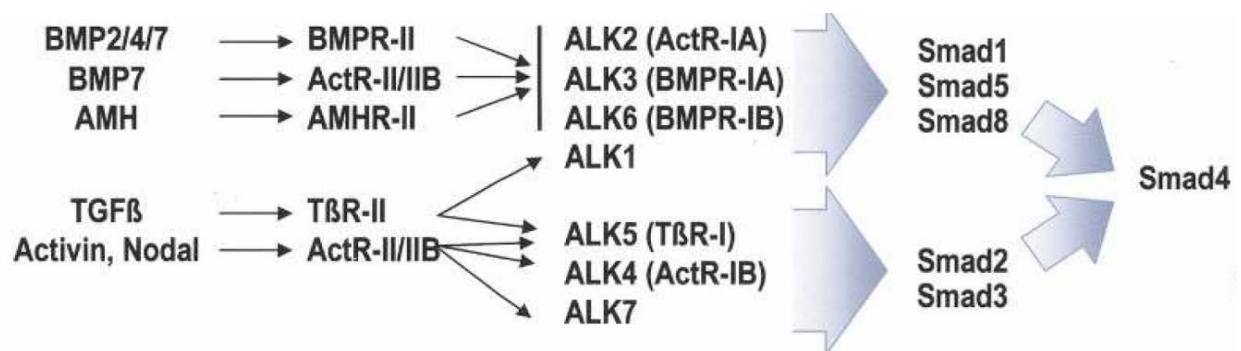


Tableau 3 : Différents acteurs engagés dans les voies de signalisation impliquant les Smads. Quelques exemples des membres de la famille du TGF- β et de leurs relations avec les récepteurs de type II, les récepteurs de type I, les R-Smads, et la Co-Smad unique (d'après Massagué *et al.*, 2005).

celui-ci recrute et phosphoryle le récepteur de type I dénommé ALK (*Activin-Like Kinase*). Ce dernier phosphoryle à son tour les Smads spécifiques, R-Smad, qui s'associent ensuite avec la Co-Smad, Smad4. L'ensemble de ces complexes (R-Smad/Smad4) sera transloqué dans le noyau (Massagué, 1998). Ils vont enfin se lier aux facteurs de transcription afin d'activer ou inhiber des gènes cibles potentiels (Figure 34). Les I-Smads (Smad 6 et 7) exercent un effet inhibiteur en empêchant l'association des R-Smads aux récepteurs de type I ainsi qu'à Smad 4 (Shi & Massagué, 2003).

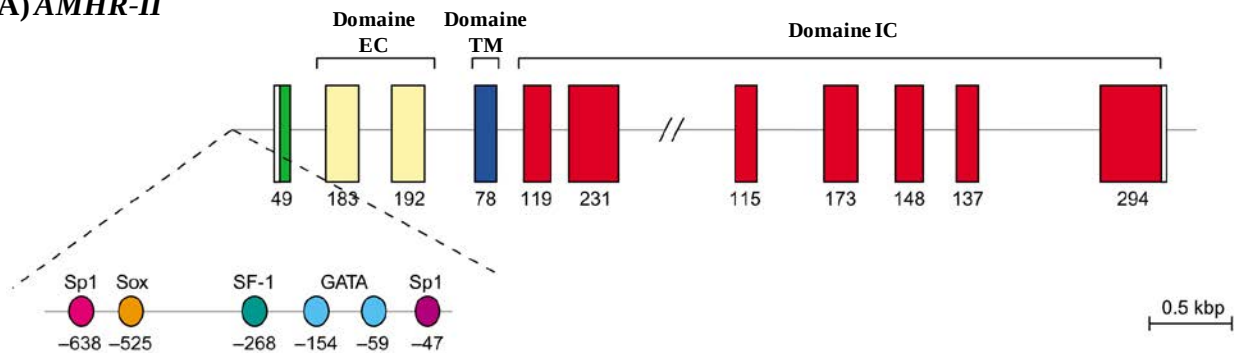
Les voies de transduction impliquées dans la superfamille du TGF- β sont divisées en deux groupes distincts : le premier groupe, contenant les activines et TGF- β s, transmet ses effets via ALK4 ou ALK5 et Smad2 ou Smad3, alors que le deuxième groupe, comportant les BMPs et GDFs, transmet ses signaux par ALK1, ALK2, ALK3 ou ALK6 et Smad 1, Smad5 ou Smad 8 (Tableau 3) (Massagué *et al.*, 2005).

III.3.2) Récepteur de l'AMH de type II (AMHR-II)

III.3.2.1) Clonage du gène *Amhr-II*

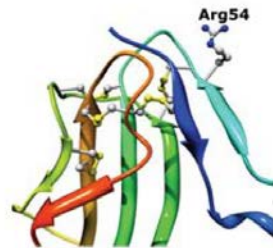
Le gène de l'*AMHR-II* a été cloné en 1994 de façon concomitante par deux groupes indépendants en utilisant des stratégies différentes. En effet, un groupe hollandais (Baarends *et al.*, 1994) a isolé un clone d'ADNc, C14, à partir d'une banque d'ADNc de cellules de Sertoli de rat. L'homologie structurale de ce clone avec celles des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase de la famille du TGF- β , ainsi que son expression dans les organes cibles de l'AMH, ont été des indicateurs que C14 pourrait coder un récepteur de l'AMH. Une autre équipe franco-américaine (di Clemente *et al.*, 1994a) a criblé une banque d'expression d'ovaire fœtal de lapine avec une sonde dégénérée codant une séquence consensus conservée entre les récepteurs des TGF- β s et des activines : YMAPEV. Cette sonde a permis d'isoler les homologues de ces récepteurs chez le lapin, malgré la présentation par cet homologue d'une séquence YMAPEL ayant une différence d'une seule base par rapport à la sonde. Plus tard, l'*Amhr-II* a été cloné chez l'homme (Imbeaud *et al.*, 1995; Visser *et al.*, 1995), le rat (Teixeira *et al.*, 1996) et la souris (Mishina *et al.*, 1997).

A) *AMHR-II*



B) *AMHR-II*

Domaine EC: 127 aa



Domaine IC: 403 aa

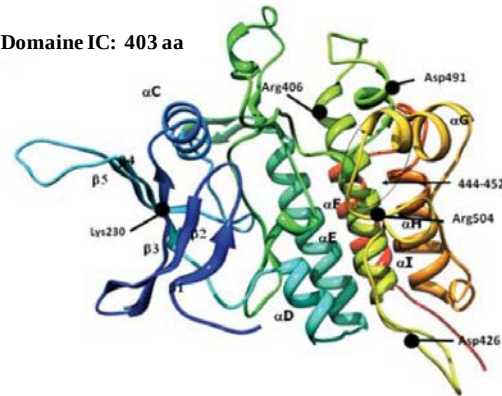


Figure 35 : Structure moléculaire du gène *AMHR-II* et de la protéine *AMHR-II* humains. **A)** L'*AMHR-II* contient 11 exons répartis sur plus de 8 kbp. Le premier exon code pour le peptide signal (vert), les 2^{ème} et 3^{ème} exons codent le domaine extracellulaire (jaune), le 4^{ème} exon code le domaine transmembranaire (bleu) et enfin, les sept derniers exons codent le domaine intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase (rouge). Le promoteur contient des sites de liaison pour différents facteurs de transcription. **B)** Modélisation moléculaire tridimensionnelle de l'*AMHR-II*. Représentation des domaines extracellulaire de 127 aa à gauche et intracellulaire de 403 aa à droite (d'après Josso & di Clemente, 2003 ; Belville *et al.*, 2009).

III.3.2.2) Structure moléculaire du gène et de la protéine

L'*AMHR-II* est situé sur le chromosome 12 humain (12q12-q13) et divisé en 11 exons se répartissant sur 8 kb. L'exon 1 code le peptide signal, les exons 2 et 3 codent, quant à eux, le domaine extracellulaire, l'exon 4 code le domaine transmembranaire et enfin les exons 5-11 sont spécifiques du domaine intracellulaire (Figure 35A). L'exon 2 subit un épissage alternatif chez le lapin générant deux transcrits fortement exprimés dans les organes cibles de l'AMH ainsi que dans les cellules de Sertoli (di Clemente *et al.*, 1994a). Cependant, aucun épissage alternatif n'a été observé chez l'homme (Imbeaud *et al.*, 1995) ou chez le rat (Baarends *et al.*, 1994).

L'*AMHR-II* code une protéine transmembranaire de 573 aa, avec un poids moléculaire de 82 kDa pour la forme mature (Faure *et al.*, 1996), incluant le peptide signal de 17 aa, un domaine extracellulaire de 127 aa, se liant à l'hormone et portant deux sites potentiels de glycosylation, ainsi qu'un court domaine transmembranaire unique de 26 aa et un volumineux domaine intracellulaire de 403 aa à activité sérine/thréonine kinase (Figure 35B). L'homologie entre l'*AMHR-II* humain et celui du lapin et du rat est de 82% et 78.2% respectivement. Dix cystéines dans le domaine extracellulaire et quatorze autres dans le domaine intracellulaire ont été détectées chez ces espèces (Imbeaud *et al.*, 1995). Cette forme de la protéine est la forme mature qui s'exprime à la surface des cellules, se lie à l'AMH et est insensible à l'endoglycosidase H (di Clemente *et al.*, 2003).

III.3.2.3) Site de l'expression

À l'inverse des autres membres de la famille du TGF- β qui sont exprimés dans la plupart des tissus, l'*AMHR-II* s'exprime exclusivement dans les gonades et les organes reproducteurs où l'AMH exerce ses effets biologiques. En effet, des études par HIS ont montré qu'au cours de la vie fœtale, pendant la période où les canaux de Müller sont très sensibles, l'ARNm de l'*Amhr-II* est initialement exprimé par l'épithélium coelomique des crêtes urogénitales des deux sexes (Zhan *et al.*, 2006). Puis, chez les mâles, la liaison de l'AMH avec l'*AMHR-II* induit la migration des cellules exprimant l'*AMHR-II* vers les cellules mésenchymateuses entourant l'épithélium dans les canaux de Müller à 15.5 jpc, ce qui correspond à une transition épithélio-mésenchymateuse. Chez les femelles, en l'absence de l'AMH, l'expression de l'*AMHR-II* reste dans l'épithélium coelomique au moins jusqu'à ce stade (15.5 jpc) (Baarends *et al.*, 1994; di Clemente *et al.*, 1994a; Josso & di Clemente, 2003; Zhan *et al.*, 2006) (Figure 36). Cette expression explique la capacité de l'AMH à faire régresser ou dédifférencier les cellules épithéliales du canal de Müller par un mécanisme paracrine *via* le mésenchyme (Tsuji

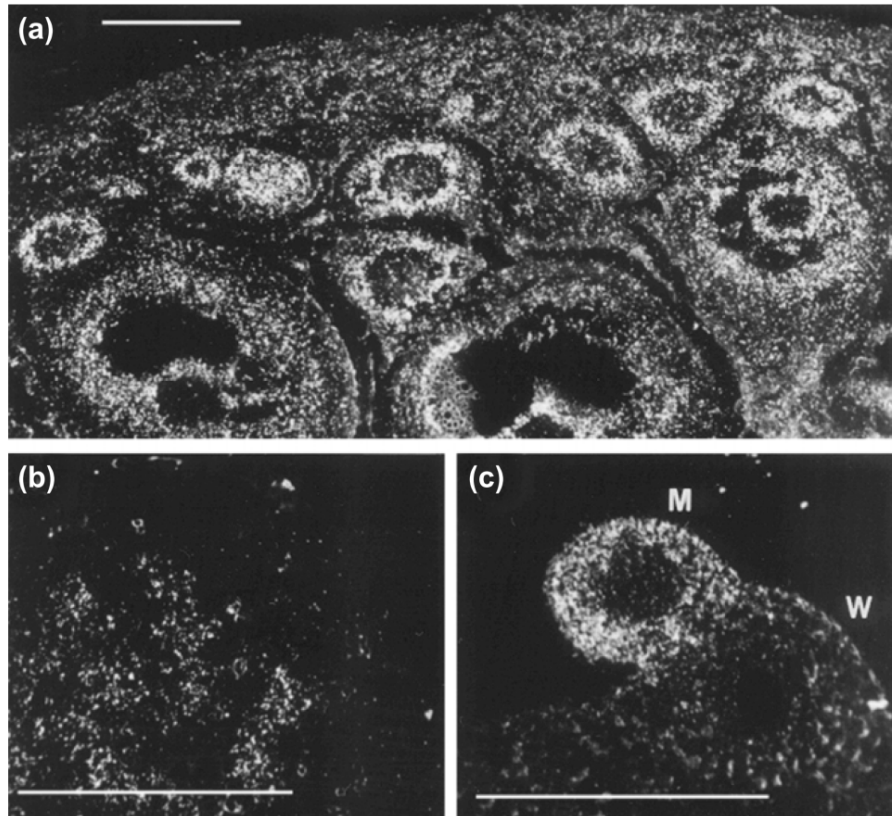


Figure 36 : Hybridations *in situ* montrant l'expression de l'*AMHR-II* dans divers tissus de lapin. A) Dans l'ovaire adulte de 16 semaines, le gène *AMHR-II* est exprimé par les cellules de la granulosa des follicules primaires, préantraux et petits antraux. **B)** Dans le testicule fœtal, son expression est détectée dans les cellules de Sertoli. **C)** Dans le tractus génital d'un fœtus femelle de 18 jours, au moment de la régression des canaux de Müller chez les mâles, l'*AMHR-II* est exprimé par les cellules mésenchymateuses qui entourent l'épithélium Müllerien. Barres = 100 μ m (d'après Josso & di Clemente, 2003).

et al., 1992). Par ailleurs, il a été montré que chez le fœtus du rat, un gradient de l'AMHR-II est en corrélation avec la régression cranio-caudale du canal de Müller provoquée par l'AMH (Allard *et al.*, 2000).

Dans le testicule, il est exprimé dès le début de la vie fœtale jusqu'à la puberté. Il continue son expression à l'âge adulte chez les rongeurs, avec un maximum observé au stade VII du cycle spermatogénique, au moment du pic d'expression de l'AMH (Baarends *et al.*, 1995b). Par contre, cette expression est réprimée après la puberté chez le lapin (di Clemente *et al.*, 1994a). Son expression a été initialement découverte dans les cellules de Sertoli (Baarends *et al.*, 1994; di Clemente *et al.*, 1994a), ensuite sa présence a été détectée dans les cellules de Leydig adultes (Racine *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999).

L'AMHR-II est exprimé dans l'ovaire dès sa formation et son expression y est constante tout au long de la vie (Baarends *et al.*, 1994; Durlinger *et al.*, 2002a; Arango *et al.*, 2008). L'expression est homogène dans l'ovaire néonatal (5 jpp) puis se retrouve principalement dans les cellules de la granulosa des follicules primaires et pré-antraux (Baarends *et al.*, 1995a) (Figure 36). De plus, l'AMHR-II a été détecté dans l'utérus normal (Arango *et al.*, 1999) ainsi que dans l'utérus gravide (Teixeira *et al.*, 1996). Il s'exprime non seulement dans les cellules de la granulosa (Baarends *et al.*, 1995a; di Clemente *et al.*, 1994a) mais aussi dans les cellules de la thèque (Ingraham *et al.*, 2000).

Par ailleurs, AMHR-II est exprimé dans les lignées cellulaires dérivées des cellules de Sertoli comme SMAT-1 (Dutertre *et al.*, 1997), des cellules de la granulosa comme AT29C (Dutertre *et al.*, 2001), ainsi que des cellules de Leydig comme MA-10, R2C (Teixeira *et al.*, 1999). De même, il est également exprimé dans certaines lignées de cancer ovarien (Masiakos *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 2000), dans les glandes mammaires et les lignées de cancers du sein (Segev *et al.*, 2000; 2001), l'utérus (Renaud *et al.*, 2005; Arango *et al.*, 2008; Bakkum-Gamez *et al.*, 2008), la prostate (Segev *et al.*, 2002) et les motoneurons (Wang *et al.*, 2005). Cependant, le niveau d'expression dans ces dernières lignées est très faible et le récepteur est différent de la forme mature (63-65 kDa au lieu de 82 kDa) (Faure *et al.*, 1996).

III.3.2.4) Régulation de l'AMHR-II

Le promoteur de l'AMHR-II contient plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription synthétisés par les cellules somatiques des gonades. En effet, l'activité promotrice minimale a été identifiée dans 1,1 kb et 1,6 kb de la région 5' de l'*Amhr-II* chez le

rat et l'homme respectivement. Les analyses de ces promoteurs n'ont révélé aucune boîte canonique (TATA ou CCAAT), par contre, des sites de fixation consensus bien définis existent dans les séquences promotrices du gène (Figure 35A). Ainsi, deux sites Sp1 à -47 pb et à -638 pb, un site SOX à -525 pb, et deux motifs GATA à -59 pb et -154 pb en amont du site d'initiation de la transcription d'*AMHR-II* humain ont été détectés. Chez le rat, dans le promoteur, un seul site Sp1 à -47 pb et un autre pour GATA à -49 pb du site d'initiation de la transcription ont été précisés. Par ailleurs, l'alignement des séquences promotrices des gènes *Amhr-II* chez le rat et l'homme a permis de démontrer un élément consensus de réponse à SF-1 (CCAAGGTCA), localisé à -268 pb chez l'homme et deux autres situés à -200 pb et à -250 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène chez le rat (de Santa Barbara *et al.*, 1998b; Teixeira *et al.*, 1999).

De plus, Wnt7a, qui est exprimée dans l'épithélium des canaux de Müller, est nécessaire pour activer l'expression de l'*Amhr-II* dans le mésenchyme. En effet, il a été montré que les souris mâles portant une invalidation homozygote de *Wnt7a* présentent des canaux de Wolff normaux avec une persistance de dérivés des canaux de Müller indifférenciés. Wnt7a est donc nécessaire pour permettre l'action de l'AMHR-II, en rendant le mésenchyme apte à répondre à l'hormone (Miller & Sassoon, 1998; Parr & McMahon, 1998). Il avait également été suggéré que la FSH et l'E₂ jouent un rôle de régulateurs négatifs de l'*Amhr-II* au moment de la transition des petits follicules antraux en larges follicules antraux (Baarends *et al.*, 1995a).

III.3.2.5) Les modèles Knock-out de l'AMHR-II

L'inactivation du gène de l'*Amh* ou de son récepteur *Amhr-II* chez la souris conduit au même phénotype : la présence d'un utérus chez les individus mâles (Behringer *et al.*, 1994; Mishina *et al.*, 1996). En effet, les souris transgéniques dans lesquelles l'*Amhr-II* a été supprimé par une recombinaison homologe (Mishina *et al.*, 1996) sont très semblables à des souris AMH-déficientes et à des patients atteints de PMDS, sauf que, chez la souris, les testicules, descendus normalement, montrent une atrophie tubulaire accompagnée d'hyperplasie des cellules de Leydig (Josso & di Clemente, 2003), alors que l'histologie des testicules est normale chez les jeunes patients atteints de PMDS. En outre, les souris femelles portant le transgène MT-hAMH (AMH humain sous le contrôle du promoteur du gène de la métallothionéine), dont l'*AMHR-II* est également invalidé, sont fertiles et possèdent un système reproducteur normal ayant des canaux de Müller et des ovaires avec des CG (Mishina *et al.*, 1999). Ces résultats montrent que les anomalies affectant le système reproducteur des souris femelles transgéniques, qui

expriment des niveaux élevés d'AMH humaine, sont médiées par le récepteur AMHR-II et pas par d'autres récepteurs du TGF- β (Mishina *et al.*, 1999).

III.3.2.6) Le syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS)

III.3.2.6.1) Biologie et bases moléculaires du PMDS

Le syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS), également appelé syndrome de «l'homme à utérus», est une forme rare de pseudohermaphrodisme masculin caractérisée par la présence de dérivés müllériens, un utérus et/ou des trompes de Fallope, chez des garçons 46, XY normalement virilisés (Belville *et al.*, 1999; Josso *et al.*, 2005). Les circonstances de la découverte de PMDS sont chirurgicales, à l'occasion d'une intervention pour une cryptorchidie ou une hernie inguinale chez des garçons avec des organes génitaux externes normaux. La prévalence de ce syndrome méconnu - de l'ordre d'une naissance sur 100 000 garçons en France - est probablement sous-estimée. Il s'agit d'une affection récessive autosomique liée à une mutation génique soit de l'AMH soit de son récepteur de type II. En effet, une étude génétique, impliquant plus d'une centaine de familles, a montré que la maladie est due, dans environ 45% des cas, à des mutations du gène de l'AMH, et dans 40% des cas, à des mutations du gène de son récepteur AMHR-II. Pour les 15% de cas restants, l'origine de ces PMDS reste encore inconnue, aucune anomalie n'ayant été trouvée sur ces deux gènes. Les mutations au niveau d'AMH se trouvent généralement chez les patients d'origine méditerranéenne ou arabe, tandis que celles de l'AMHR-II se trouvent plus souvent chez les patients du nord de l'Europe ou des Etats-Unis (Josso *et al.*, 2005).

La recherche des mutations impliquées dans le PMDS est guidée par un dosage préalable de l'AMH sérique grâce à un test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) spécifique. En effet, les concentrations d'AMH sériques sont généralement faibles, voire indétectables, chez les patients ayant des mutations au niveau du gène AMH, et normales chez ceux ayant des mutations du récepteur (Josso *et al.*, 2005).

III.3.2.6.2) Mutations du gène AMH

Différentes mutations ont été détectées chez les patients PMDS. En effet, depuis 1989, plusieurs études ont révélé la présence de 38 mutations localisées sur le gène de l'AMH (Guerrier *et al.*, 1989; Josso *et al.*, 2005). Elles sont identifiées sur toute la longueur du gène

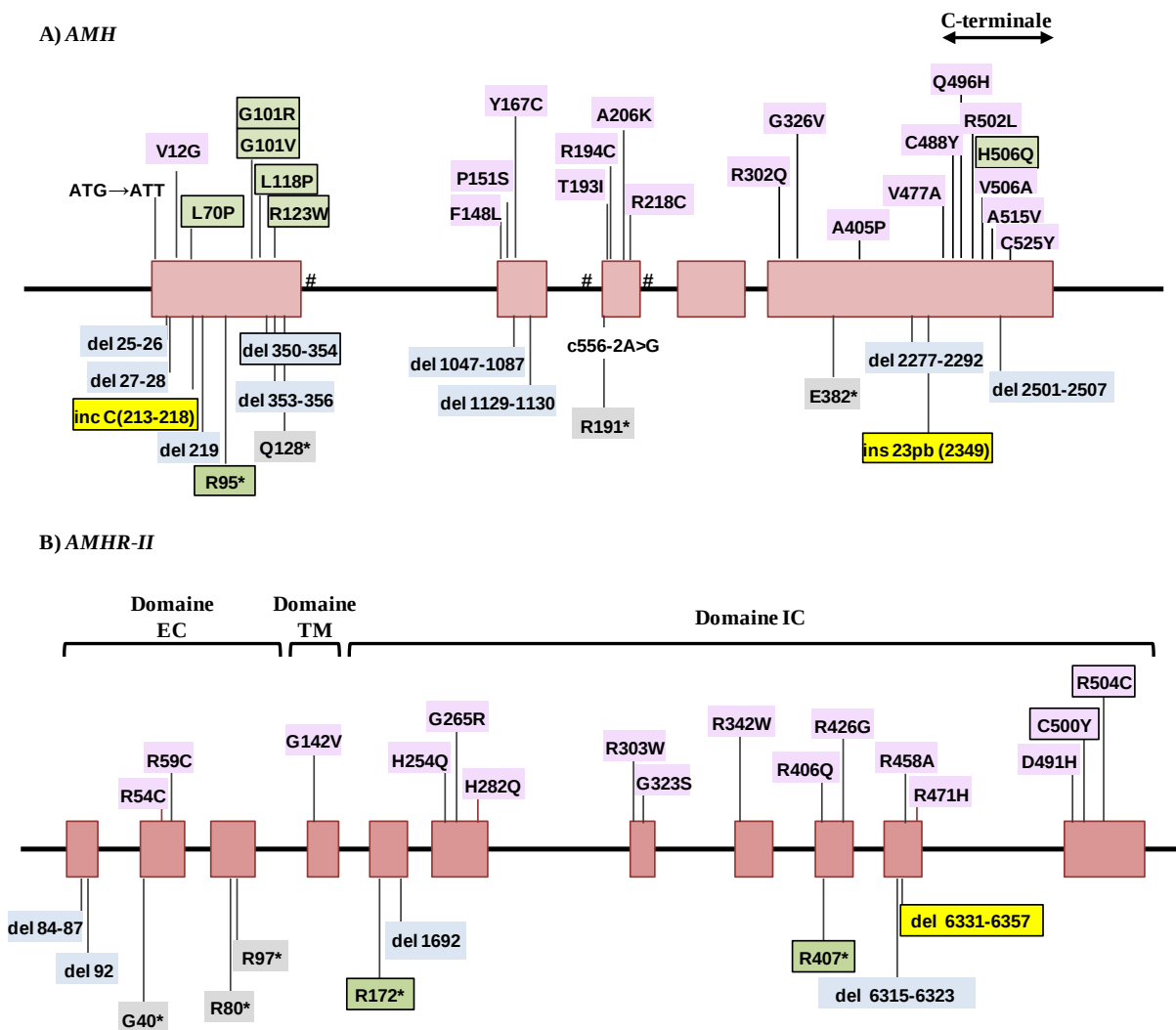


Figure 37 : Différentes mutations dans les gènes *AMH* et *AMHR-II* identifiées chez les patients PMDS. Les mutations faux-sens sont indiquées au-dessus des gènes, les insertions et des délétions de paires de bases ainsi que d'autres mutations sont affichées au-dessous des gènes. Les boîtes entourées indiquent les mutations récurrentes. # : indique les mutations de sites d'épissage (d'après Josso *et al.*, 2005; Nishi *et al.*, 2012).

sauf sur l'exon 4. Elles sont particulièrement fréquentes dans l'exon 1 et l'extrémité 3' de l'exon 5 codant le domaine C-terminal bioactif (Josso *et al.*, 2005) (Figure 37A). En effet, sept mutations dans l'*AMH* ont été bien étudiées ; trois sont situées dans l'extrémité N-terminale (del350–354, del2277–2292 et R194C) et quatre sont localisées dans l'extrémité C-terminale (V477A, Q496H, H506Q R218C et C525Y) (Belville *et al.*, 2004). Ainsi, il a été montré que trois de ces mutants (350–354del, 2277–2292del et C525Y) sont dépourvus de tout ou partie du domaine C-terminal et sont donc incapables d'interagir avec les récepteurs. En plus, trois autres mutants (R194C, V477A et H506Q) ont des problèmes potentiels de conformation et de stabilité. Alors que le mutant R194C n'est pas sécrété, les H506Q et V477A sont sécrétés à faible niveau. Enfin, le mutant Q496H semble être normal au niveau de la biosynthèse et la sécrétion, par contre, il n'est pas capable d'interagir de façon appropriée avec le récepteur de type I (Belville *et al.*, 2004).

III.3.2.6.3) Mutations du gène *AMHR-II*

Chez les patients PMDS, 38 mutations différentes d'*AMHR-II* ont été identifiées jusqu'à 2009 (Figure 37B). En effet, les mutations faux-sens, les mutations affectant l'épissage, des insertions et des délétions de paires de bases (pb) ont été trouvées sur toute la longueur du gène. La mutation la plus fréquente affecte 53% des patients atteints d'une mutation du récepteur. Il s'agit d'une délétion de 27 pb, (del6331-6357), située sur l'exon 10 (Imbeaud *et al.*, 1996).

En outre, parmi ces nombreuses mutations, trois seulement ont été étudiées en détail. La première est une mutation d'épissage qui détruit un nucléotide invariant dans l'extrémité 5' du 2^{ème} intron, générant deux ARNm anormaux: un court ARNm dépourvu du 2^{ème} exon nécessaire pour la liaison au ligand, et un long ARNm intégrant les 12 pb du 2^{ème} intron (Imbeaud *et al.*, 1995). Ces deux mutants sont incapables d'atteindre la surface de la cellule et donc de lier à l'AMH exprimée dans des cellules COS (*Cercopithecus aethiops*, *Origin-defective SV-40*), car ils sont retenus dans le réticulum endoplasmique (Faure *et al.*, 1996). Les deux autres mutations sont spécifiques du domaine kinase. En effet, une de ces mutations est une délétion d'une seule base (del1692) conduisant à former un codon-stop, et donc un récepteur tronqué localisé après le domaine transmembranaire. L'autre est une mutation faux-sens dans le site putatif de liaison du substrat du domaine kinase (R406Q). Ces deux récepteurs mutants d'*AMHR-II* peuvent agir comme des dominants négatifs *in vitro*, lorsqu'ils sont surexprimés, pour bloquer la réponse fonctionnelle à l'AMH (Messika-Zeitoun *et al.*, 2001). Par ailleurs, les mutations du domaine intracellulaire de l'*AMHR-II* n'affectent pas son

expression à la surface cellulaire, mais elles peuvent empêcher la transduction du signal, probablement en détruisant l'activité kinase du récepteur (di Clemente & Belville, 2006).

Belville et ces collègues ont identifié dix mutations dans l'*AMHR-II* chez des sujets atteints de PMDS, dont quatre identifiées dans le domaine extracellulaire se liant à l'AMH (R54C, R80Stop, R97Stop et G142V), et six mutations dans le domaine intracellulaire ayant l'activité sérine/thréonine kinase, dont deux contiennent des suppressions importantes (R406Q, R426G, D491H, R504C, del1692 et del6331-6357). En plus, les effets de ces mutations sur la biosynthèse d'*AMHR-II*, la structure et la fonction ont été également étudiés (Belville *et al.*, 2009). Il a été montré que huit récepteurs mutants sont capables de s'exprimer à la surface cellulaire, mais ils ne peuvent ni lier l'AMH, ni transduire son signal. Pour bien comprendre le mode d'action de ces mutations sur la structure et la fonction des domaines extra/intracellulaires, il est important de déterminer ses effets au niveau moléculaire. Ainsi, il a été démontré que la sécrétion de deux récepteurs d'*AMHR-II* solubles tronqués en amont du domaine transmembranaire ne s'est pas produite, à moins que la séquence signal des récepteurs du TGF- β (T β R-II) n'ait été substituée à une séquence endogène. Cela montre que la séquence signal d'*AMHR-II* n'est pas fonctionnelle et suggère que l'*AMHR-II* utilise son domaine transmembranaire au lieu de sa séquence signal afin de se déplacer vers le réticulum endoplasmique (Belville *et al.*, 2009), ce qui est une caractéristique des protéines membranaires de type III (Goder & Spiess, 2001).

Récemment, plusieurs nouvelles mutations au niveau de l'*AMH* et de son récepteur (*AMHR-II*) ont été aussi identifiées par plusieurs équipes chez des patients atteints de PMDS de différents pays (Lang-Muritano *et al.*, 2001; Menabò *et al.*, 2008; Mazen *et al.*, 2011; van der Zwan *et al.*, 2012; Nishi *et al.*, 2012; Abduljabbar *et al.*, 2012). Enfin, les différentes mutations d'*AMH* et d'*AMHR-II* identifiées jusqu'à ce jour sont illustrées dans le Figure 37.

III.3.3) Récepteurs de l'AMH de type I

Comme l'AMH est un membre de la superfamille du TGF- β , il a été supposé que son signal passe par deux récepteurs à activité sérine/thréonine kinase. Beaucoup d'efforts ont été consacrés afin de cloner un nouveau récepteur de type I spécifique de l'AMH, mais il a été suggéré que l'AMH pourrait partager un récepteur de type I avec d'autres membres de la famille. L'identité de ce récepteur a été obtenue en déterminant la nature de la molécule Smad qui agit comme effecteur en aval de l'AMH. En effet, il a été montré que l'AMH active la voie Smad 1, 5 et 8 dans tous ses organes cibles (Gouédard *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2001; Dutertre

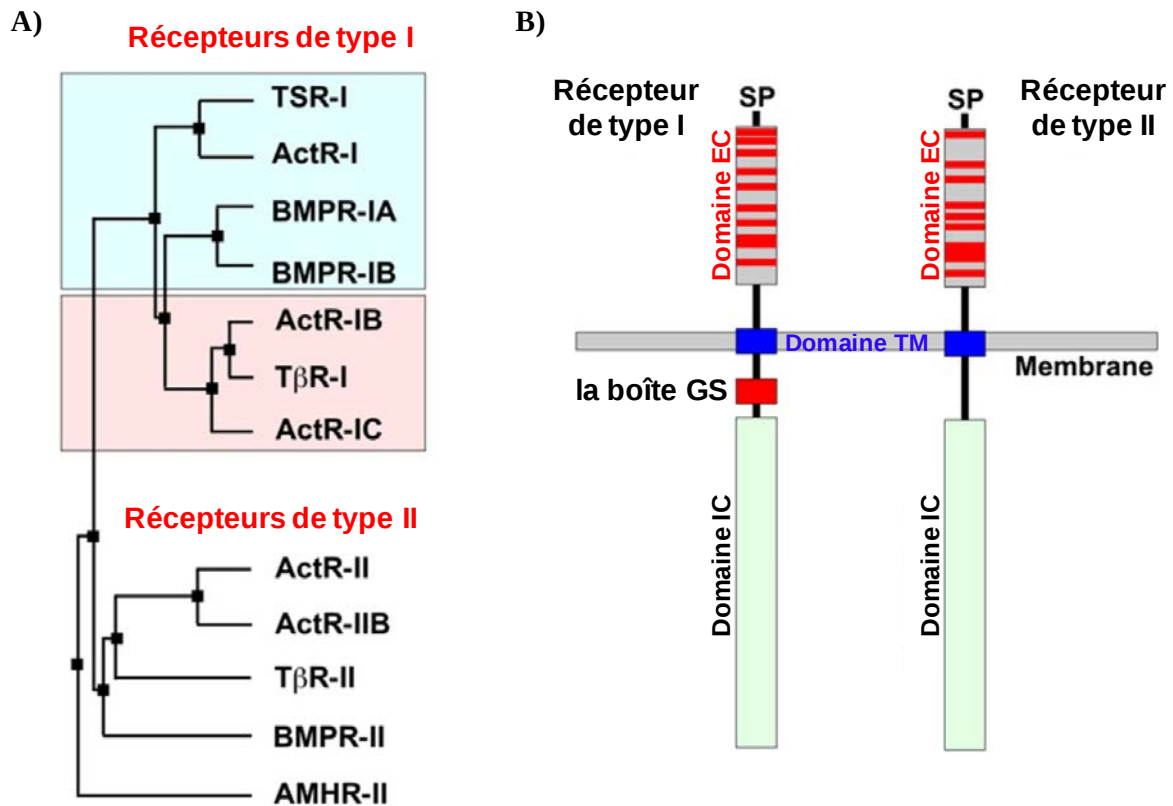


Figure 38 : Caractéristiques phylogénétiques et moléculaires des récepteurs de type I et II du TGF- β . **A)** Arbre phylogénétique (seulement les domaines kinases ont été utilisés pour l'analyse) des récepteurs du TGF- β montrant que les types I et II sont classés en deux sous-groupes. Pour les récepteurs de type I, la couleur bleu indique l'utilisation de la voie SMAD 1/5/8, alors que la couleur rose indique l'utilisation de la voie SMAD 2/3. **B)** Les récepteurs du TGF- β de type I et II sont constitués d'un domaine N-terminal extracellulaire (EC) auquel se lie le ligand, un domaine transmembranaire (TM) et un domaine kinase intracellulaire (IC). Les parties extracellulaires comprennent dix résidus cystéine dans les deux types de récepteurs, mais avec une disposition séquentielle distincte (bandes rouges). Un domaine intracellulaire riche en glycine/sérine (GS-box) caractéristique du récepteur de type I est essentiel pour l'activité kinase et l'activation de la voie SMAD (d'après Mueller & Nickel, 2012).

et al., 2001; Visser *et al.*, 2001), voie de signalisation commune aux BMPs et pas à celle des TGF- β s ou des activines, dont le signal passe *via* Smad 2 et 3. Par conséquent, il a été suggéré que l'AMH et les BMP pourraient aussi partager les récepteurs de type 1 nommés ALKs ; ALK2, alias ActR-IA; ALK3, alias BMPR-IA, et ALK6, alias BMPR-IB (Lo *et al.*, 1998).

III.3.3.1) Structure moléculaire

Les récepteurs de type I sont, comme celui de type II, des récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase. Ils ressemblent structuralement aux récepteurs II, et ont une homologie de séquence considérable, même s'ils sont généralement plus petits avec une longueur de 503 à 532 aa. La similarité de séquence entre les récepteurs I est très élevée. Leurs domaines extracellulaires sont plus courts que celui du récepteur II, avec 10 cystéines conservées, y compris un groupe de trois cystéines qui sont également présentes dans le récepteur II. Le domaine transmembranaire est suivi par le domaine « juxtamembranaire » qui a une taille similaire à celui correspondant au récepteur II. Cependant, contrairement au récepteur II, la boîte GS contenant la séquence (SGSGSGLP) riche en glycine/sérine, caractéristique du récepteur I et hautement conservée, précède immédiatement le domaine sérine/thréonine kinase. Enfin, l'extrémité C-terminale se compose seulement de quelques aa à l'inverse de celle de récepteur II beaucoup plus longue (Figure 38).

III.3.3.2) Les caractéristiques d'AMHR-I

III.3.3.2.1) L'Interaction avec AMHR-II

Le premier récepteur identifié comme un récepteur de type I était ALK6 grâce à sa capacité d'interagir d'une manière ligand-dépendante avec l'AMHR-II dans les cellules surexprimant l'AMHR-II humaine (CHO-3W, *Chinese hamster ovary*). En effet, Gouédard et ses collègues ont transfecté chacun des récepteurs de type I, marqué avec l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe, dans des cellules CHO-3W et les ont traitées avec de l'AMH. L'immunoprécipitation avec un anti-AMHR-II a été réalisée suivie d'un Western blot avec un anti-HA. Les résultats montrent que seul ALK6 interagit avec AMHR-II de façon AMH-dépendante (Gouédard *et al.*, 2000). Par contre, dans les cellules P19 cotransfectées avec l'AMHR-II, seul ALK2 médie les effets de l'AMH (Clarke *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2001).

III.3.3.2.2) Expression dans les organes cibles

Contrairement à l'AMHR-II, qui se trouve exclusivement dans les organes cibles de l'AMH, les récepteurs des BMP de type I sont exprimés dans nombreux organes et tissus (Yamashita *et al.*, 1996), au vu de leur activité multifonctionnelle. Ainsi, il a été montré que ALK2 et 3 sont essentielles pour le développement embryonnaire chez la souris. Elles fonctionnent dans les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires pour contrôler ce développement (Mishina *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 1999) alors qu'ALK6 s'exprime fortement dans les os et les muscles (Dewulf *et al.*, 1995).

Récemment, la façon dont l'AMH transduit ses effets dans les cellules de Sertoli a été étudiée. En effet, Belville *et al.* ont montré que, dans la lignée cellulaire dérivée de cellules de Sertoli immatures, SMAT1, ALK3 médie les effets de l'AMH en activant *Smad1* et en réprimant l'enzyme *P450scc*. En plus, ils ont montré que ALK2 peut compenser l'absence de ALK3 et agit probablement en synergie avec ALK3, lorsque l'AMH est fortement exprimée, afin d'activer *Smad1*, alors que ALK6 a un effet inhibiteur compétitif (Belville *et al.*, 2005).

III.3.3.2.3) L'Activation des gènes cibles

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les gènes cibles des membres du TGF- β sont activés par un complexe récepteur - Smad spécifique. Afin de confirmer l'implication des récepteurs de BMPs de type I (BMPR-I) dans la voie de signalisation de l'AMH, l'effet de l'AMH sur l'activation des gènes rapporteurs spécifiques de BMPR-I et *Smad 1*, *XVent2*, a été examiné. En effet, les cellules embryonnaires murines P19 ont été transfectées avec de l'AMHR-II seul ou avec des vecteurs codant pour ALK6 kinase-déficient (ALK6-KD), dont l'activité kinase est inactive, représentant donc des dominants négatifs de ALK6. Ces cellules transfectées ont été ensuite traitées par l'AMH et étudiées. Les résultats montrent que dans ces cellules, l'AMH a réussi à activer la cascade de signalisation induisant l'expression du gène *Xvent2*, alors que la co-transfection de ALK6-KD, qui diminue considérablement l'effet de BMP, a abrogé l'effet de l'AMH et bloqué l'activation de *XVent2* (Gouédard *et al.*, 2000).

Cependant, des oligonucléotides antisens d'une séquence codant pour ALK2 bloquent la régression des canaux de Müller en culture organotypique, ainsi qu'ils diminuent l'activation du gène rapporteur sensible à BMPR-I, *Tlx-2*, dans des cellules P19 transfectées avec AMHR-II et traitées par l'AMH. L'expression de *Tlx-2* est également atténuée par une transfection et une expression de dominants négatifs de ALK2, mais pas ALK6 (Visser *et al.*, 2001). En plus,

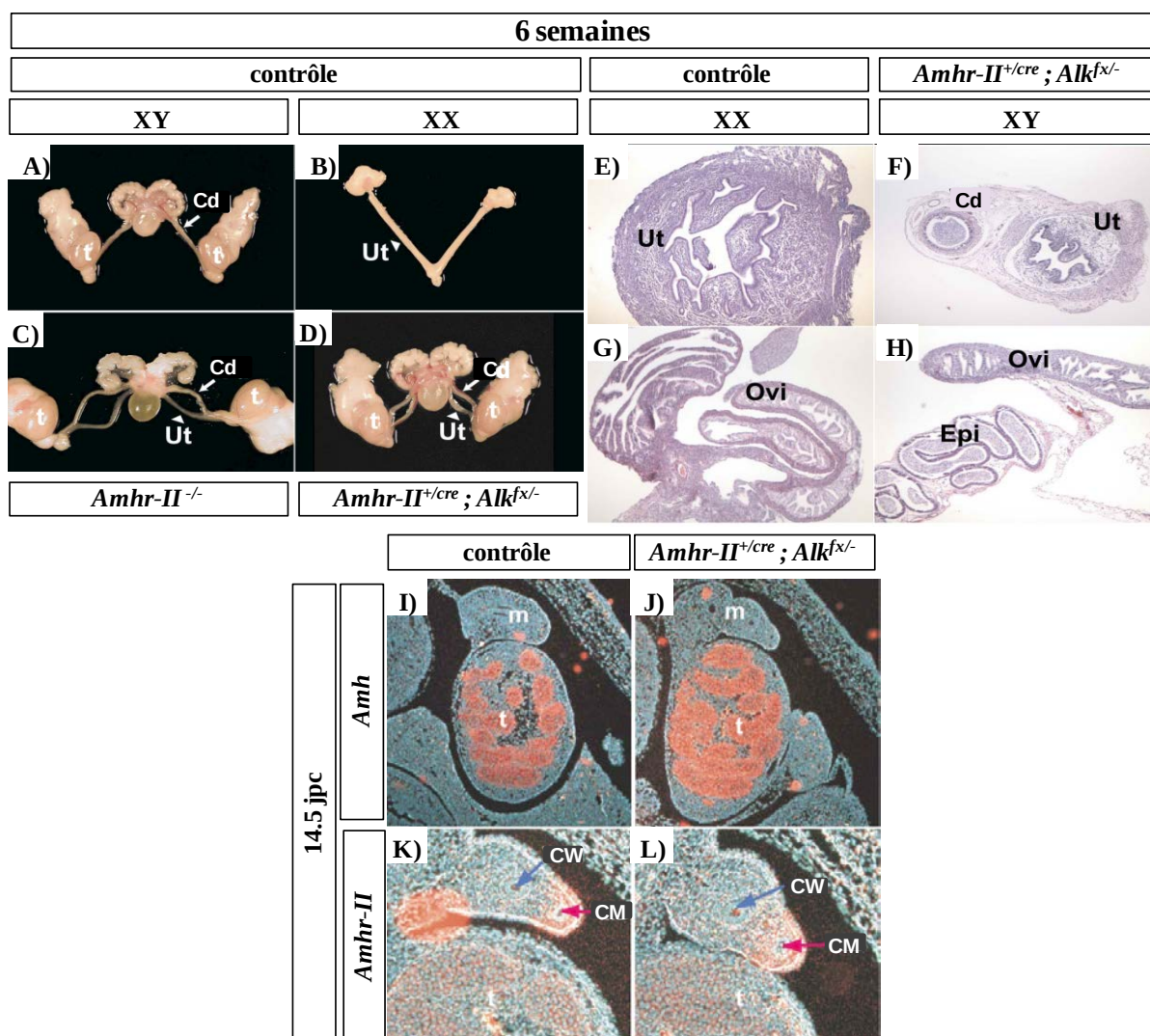


Figure 39 : Analyse morphologique, histologique et moléculaire des mâles *Alk3* cKO. A-D) Morphologie du tractus génital de souris de 6 semaines : A) mâle contrôlé B) femelle contrôlé C) mâle déficient pour *Amhr-II* ou D) mâle mutant pour *Alk3*. Les mâles déficients pour l'*Amhr-II* ou *Alk3* cKO possèdent tous les deux des oviductes et des cornes utérines (Ut, pointe de flèche) reliés au canal déférent (Cd, flèche). Le tissu conjonctif entre les cornes utérines et le canal déférent a été sectionné pour permettre la visualisation des organes reproductifs mâles et femelles. t : testicule. E-H) Coupes histologiques transversales des organes reproducteurs. E) utérus de femelle contrôlé ; F) utérus de canal déférent d'un mâle *Alk3* cKO ; G) oviducte (Ovi) de femelle contrôlé ; H) oviducte et épидидyme (Epi) d'un mâle *Alk3* cKO. I-L) Analyse de l'expression d'*Amh* et *Amhr-II* par l'hybridation *in situ* dans les testicules de fœtus de 14.5 jpc contrôles (I,K) et mutants *Alk3* cKO (J,L). I,J) marquage *Amh* et K,L) marquage *Amhr-II*. *Amh* et *Amhr-II* sont tous les deux exprimés correctement dans les cordons testiculaires (t) des mutants *Alk3* cKO. *Amhr-II* est également exprimé correctement dans le mésenchyme entourant l'épithélium du canal de Müller (CM) des mutants *Alk3* cKO. M : mésonéphros ; CW : canal de Wolff (d'après Jamin *et al.*, 2002).

l'inhibition de l'expression de *Tlx-2* par ALK2 a été également observée dans les cellules P19 transfectées avec AMHR-II à l'aide d'une série de mutants, correspondant à des récepteurs de type I tronqués (Clarke *et al.*, 2001).

III.3.3.2.4) La médiation des effets physiologiques de l'AMH

Parmi les nombreux effets exercés par l'AMH dans l'appareil reproducteur, le plus connu est la régression des canaux de Müller. Tout d'abord, l'analyse des souris KO pour les différents candidats *Alk2*, *Alk3* et *Alk6* a permis d'exclure ALK6 en tant que récepteur essentiel à la régression müllérienne (Clarke *et al.*, 2001). En effet, les souris mâle mutantes pour *Alk6* (Yi *et al.*, 2000) n'ont pas conservé les canaux de Müller (Clarke *et al.*, 2001), alors que les mâles témoins expriment ALK6 dans l'épithélium du canal de Müller, et pas dans le mésenchyme qui l'entoure avec l'AMHR-II (Dewulf *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 2001). Ceci indique que ALK6 n'est probablement pas impliqué dans la régression des canaux de Müller et que l'AMH passe par différents récepteurs de type I selon le type cellulaire.

Par contre, ALK2 et ALK3 sont essentiels au développement embryonnaire précoce et leur ablation conduit à un mort embryonnaire dès E9 (Mishina *et al.*, 1995, 1999, 2002). Le KO complet de ces gènes empêche donc toute analyse au niveau de l'appareil reproducteur, car la crête urogénitale se met en place à partir de 11,5 jpc. Pour cela, Jamin *et al.* ont choisi une approche de KO conditionnel permettant de réaliser l'ablation des différents gènes candidats dans le canal de Müller en utilisant un système « Cre-lox » ciblant les canaux de Müller sous le contrôle du promoteur d'*Amhr-II*. Donc, ils ont généré des mutants conditionnels *Amhr-II*^{+/cre} ; *Alk3*^{flx/-}, puis ils ont analysé les souris mâles mutants conditionnels pour *Alk3* (*Alk3* cKO) macroscopiquement et les ont comparé d'une part, avec des mâles et des femelles témoins et, d'autre part, avec des mâles KO pour *Amh* (Jamin *et al.*, 2002). Les résultats montrent que les mâles *Alk3* cKO possèdent un tractus génital mâle normal et complet ainsi que des structures femelles. Ce qui est identique au phénotype observé pour les mâles KO pour *Amh* et *Amhr-II* (Behringer *et al.*, 1994; Mishina *et al.*, 1996). Les structures femelles s'apparentent macroscopiquement à un utérus et un oviducte (Figure 39). Aussi, l'expression d'*Amh* et *Amhr-II*, détectée par HIS, était identique chez les animaux mutants et les témoins (Figure 39). Donc, la génération de souris mutantes conditionnelles pour le candidat *Alk3* a mis en évidence le rôle prépondérant d'ALK3 dans le processus de régression des canaux de Müller (Jamin *et al.*, 2002). Cependant, pour 40% des mâles *Alk3* cKO, une rétention des canaux de Müller partielle ou totale n'a pas été observée, suggérant qu'un autre récepteur

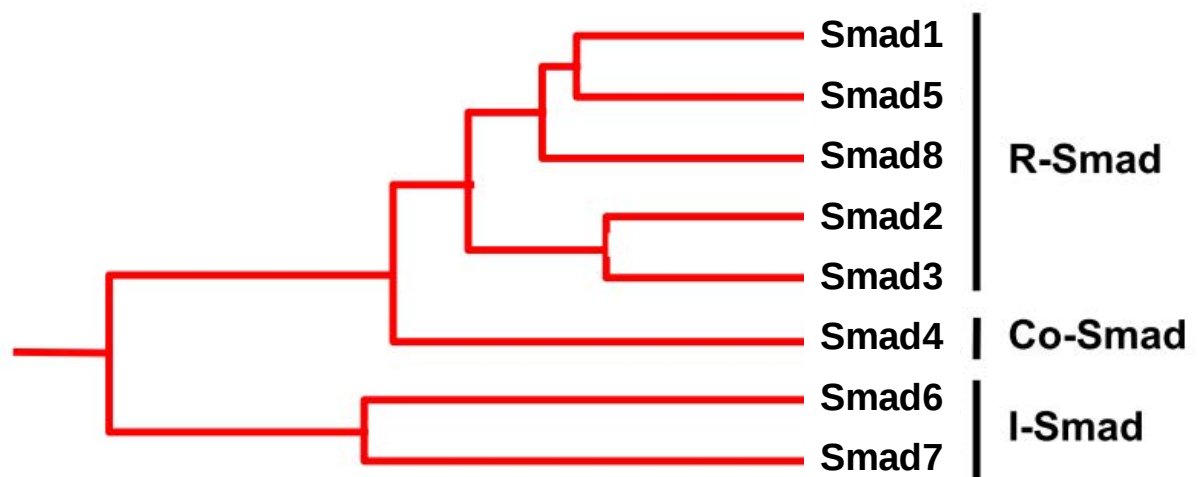


Figure 40 : La famille Smad chez les mammifères. Analyse phylogénétique des protéines Smad de mammifères (d'après Ten Dijke *et al.*, 1999).

compensait l'absence d'*Alk3*. C'est pour cela, avec la même stratégie, il a été montré qu'aucun mâle mutant conditionnel pour *Alk2* ne présentait de persistance müllérienne. De ce fait, des doubles mutants conditionnels pour *Alk2* et *Alk3* ont été générés, et présentaient tous des dérivés müllériens à 100%. L'ensemble de ces observations souligne la fonction redondante de ces deux récepteurs de type I dans le processus de régression müllérienne (Orvis *et al.*, 2008).

III.3.4) La voie de signalisation des Smad

III.3.4.1) Généralités

Les protéines Smad sont les médiateurs intracellulaires majeurs de la signalisation de type TGF- β et présentent les premiers substrats identifiés des récepteurs de type I. Elles véhiculent le signal du complexe de récepteurs membranaire jusqu'à la machinerie de transcription et sont capables de réguler l'expression de multiples gènes cibles. Les Smads, au nombre de 8 chez les mammifères, sont réparties en 3 classes en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles (Figure 40) (Massagué, 2000; Balemans & Van Hul, 2002; Lutz & Knaus, 2002) :

- Les R-Smads (*receptor-regulated Smads*) : Smad1, 2, 3, 5 et 8, sont les substrats directs des récepteurs de type I activés, les AR-Smads (Smad2 et 3) étant phosphorylées par les récepteurs de type I à l'activine et au TGF- β et les BR-Smads (Smad1, 5 et 8), par ceux qui répondent aux BMPs.

- Les Co-Smads (*common mediator Smads*), dont Smad4 est le seul membre identifié chez les mammifères, sont les partenaires obligatoires de toutes les R-Smads.

- Les I-Smads (*inhibitory Smads*), Smad6 et 7, antagonisent la signalisation de type TGF- β .

En résumé, les Smads stimulent ou répriment la transcription de plusieurs centaines de gènes de réponse immédiate aux facteurs de type TGF- β , en liant l'ADN, en recrutant d'autres facteurs de transcription ou des adaptateurs, en mobilisant la machinerie modifiant la structure de la chromatine (coactivateurs, corépresseurs et histone désacétylases (HDAC) associées) ou par une combinaison de ces différents modes (Shi & Massagué, 2003; Zwijsen *et al.*, 2003).

III.3.4.2) La voie de signalisation AMH/Smad1

La voie Smad1 comprend les trois protéines Smads spécifiques Smad1, Smad5 et Smad8. Cette voie activée par l'AMH a d'abord été identifiée dans deux lignées cellulaires d'origine

testiculaire, la lignée sertolienne SMAT-1, et la lignée leydigienne MA-10. Ces deux lignées expriment l'AMHR-II et sont sensibles à l'AMH dans le sens où cette dernière réprime d'une part, la transcription de son récepteur *AMHR-II*, et d'autre part, le clivage de la chaîne latérale du cholestérol en réprimant l'ARNm du *P450scc* (Messika-Zeitoun *et al.*, 2001). Par ailleurs, des expériences d'immunoblot et d'immunoprécipitation sur des lysats cellulaires ont montré que l'AMH, comme BMP2, induit la phosphorylation de Smad1, son interaction avec Smad4 et enfin sa translocation nucléaire (Gouédard *et al.*, 2000). En accord avec ces résultats, il a été montré que dans les cellules P19, l'AMH active un gène rapporteur spécifique pour la voie Smad1, *XVent2* (Gouédard *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2001), mais il n'active pas le gène *3TP* rapporteur spécifique pour la voie Smad2, correspondant au Smad2 et Smad3 (Gouédard *et al.*, 2000). L'activation de la voie Smad1 par l'AMH a été confirmée plus tard dans les cellules de la granulosa cibles de l'AMH, en utilisant une lignée cellulaire, dérivant de la granulosa, établie à partir d'une tumeur ovarienne obtenue par oncogénèse ciblée chez la souris (Dutertre *et al.*, 2001). Dans cette lignée, comme dans les cellules SMAT-1 (Dutertre *et al.*, 1997), l'AMH induit la phosphorylation de Smad1, puis son association avec Smad4 ainsi que la translocation nucléaire de ces deux protéines.

Pour l'identification des Smads essentielles au processus de régression des canaux de Müller, des souris mutantes pour les différents allèles Smad ont été générées (Huang *et al.*, 2002; Umans *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006; Orvis *et al.*, 2008). L'analyse de ces souris KO pour différentes Smads a révélé un rôle essentiel de Smad1 et Smad5 au cours du développement précoce. En effet, les souris KO pour *Smad1* et *Smad5* meurent très tôt au cours de l'embryogenèse (Arnold *et al.*, 2006), par contre, les souris portant des mutations nulles de *Smad8* sont viables et fertiles (Arnold *et al.*, 2006 ; Orvis *et al.*, 2008). En plus, les mâles ne présentent pas de dérivés müllériens, suggérant une faible importance de Smad8 dans le processus de régression des canaux de Müller.

En outre, l'invalidation conditionnelle du *Smad1* ou *Smad1/Smad8* chez des souris mâles n'affecte pas la régression des canaux de Müller. Ainsi, les souris mâles cKO pour *Smad1* sont fertiles et ne possèdent pas de dérivés müllériens complets. De même, chez les souris doubles mutants *Smad1/Smad8*, les canaux müllériens sont bien régressés. Par contre, l'invalidation conditionnelle de *Smad5*, dans n'importe quelle combinaison, *Smad5* ou *Smad1/Smad5* ou *Smad5/Smad8* entraîne, quant à elle, une rétention partielle des canaux de Müller. Par ailleurs, une persistance complète des canaux de Müller s'est produite seulement chez les triples mutants pour *Smad1/Smad5/Smad8*, et n'affecte pas l'expression de l'AMH

dans les cellules de Sertoli fœtales chez ces souris (Orvis *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats a démontré une fonction redondante des trois protéines Smads pour le processus de régression müllérienne (Clarke *et al.*, 2001 ; Orvis *et al.*, 2008). Enfin, les souris femelles cKO pour *Smad1/Smad5* et *Smad1/Smad5/Smad8* sont stériles et présentent des tumeurs de la granulosa (Pangas *et al.*, 2008).

En ce qui concerne le rôle de Smad4 dans la régression des canaux de Müller, des souris cKO pour *Smad4* ont été générées (Yang *et al.*, 2002). Aucun mâle ne présente des dérivés müllériens complets. Par contre, ils possèdent une structure très réduite s'apparentant au canal de Müller. L'analyse histologique a confirmé l'origine müllérienne des structures observées. Ces résultats minimisent l'implication de Smad4 en tant que médiateur unique des Smad 1, 5 et 8 (Jamin, 2010).

III.4) Rôle de l'AMH chez les vertébrés

III.4.1) Chez les mammifères

III.4.1.1) Dans le développement gonadique

L'effet physiologique principal de l'AMH, qui a conduit le professeur Alfred Jost à supposer l'existence d'une deuxième hormone testiculaire fœtale distincte de la testostérone (Jost, 1953), est la régression des canaux de Müller chez les fœtus mâles. Plus tard, l'idée que l'AMH pourrait également jouer un rôle dans le développement gonadique a commencé après l'étude de free-martins. En effet, les free-martins sont des génisses résultant d'une grossesse de faux-jumeaux chez les bovins. Au cours de la gestation, lorsque des larges anastomoses placentaires se forment, les sécrétions testiculaires sont transportées vers l'embryon femelle, en donnant à la naissance, des femelles stériles qui semblent extérieurement normales, mais qui ne possèdent ni utérus, ni oviductes ; leurs ovaires sont très petits et dépourvus de CG mais ils contiennent parfois des tubes séminifères. Le retard de la croissance ovarienne commence pendant la vie fœtale, en même temps que la régression des canaux de Müller des deux jumeaux. Chez certains fœtus, les tubes séminifères ainsi que les cellules de Leydig se développent dans les ovaires en fin de grossesse (Jost *et al.*, 1972). Jost et ses collègues ont suggéré que l'effet masculinisant sur l'ovaire et les canaux de Müller du fœtus pourrait être dû à l'AMH produite par les testicules du jumeau mâle (Josso *et al.*, 1998; Capel & Coveney, 2004; Josso, 2008).

La preuve de cette hypothèse a été obtenue *in vitro* par Vigier et al. (1987) en exposant lors de cultures organotypiques les ovaires de fœtus de rat à l'AMH bovine purifiée. Ils ont observé une diminution du volume des gonades, une perte des CG et une formation des structures tubulaires analogues à des tubules séminifères. De plus, des résultats concordants ont été obtenus par Behringer *et al.* (1990) qui ont généré des souris transgéniques surexprimant l'*Amh* (MT-hAMH). Les femelles obtenues étaient stériles ; elles ne possèdent pas d'utérus, ni d'oviductes et leurs ovaires dégénèrent progressivement tandis que des structures tubulaires analogues à des tubules séminifères apparaissent. Les souris mâles transgéniques obtenues étaient toutes normales sauf deux lignées dont l'appareil génital externe était féminisé avec un vagin et des glandes mammaires anormalement développées tandis que leurs testicules étaient de petite taille, non descendus et dépourvus de CG. Les auteurs ont conclu qu'un haut niveau d'AMH chez les femelles induit la trans-différenciation de cellules de la granulosa en cellules de Sertoli ainsi que la formation des tubules séminifères, tandis que chez les mâles, il altère le développement testiculaire et ce phénomène résulterait d'une inhibition de la synthèse des androgènes (Vigier *et al.*, 1987; Behringer *et al.*, 1990; Behringer, 1995).

III.4.1.2) Dans la stéroïdogenèse

L'AMH affecte également la fonction ovarienne en renversant la voie stéroïdogénique des œstrogènes aux androgènes, par l'inhibition de l'activité de l'aromatase. En effet, il a été d'abord montré que les ovaires de fœtus de mouton traités par l'AMH ne sont plus capables de libérer l'E₂ ; à l'inverse ils sécrètent la testostérone à des niveaux comparables à ceux observés dans les testicules témoins (Vigier *et al.*, 1989). Plus tard, des expériences effectuées sur des cellules de la granulosa isolées, ont montré que cet effet est médié par l'inhibition de la transcription du gène de l'aromatase ainsi que le récepteur de la LH (*Hormone Lutéinisante*) (di Clemente *et al.*, 1994b). L'effet de l'AMH sur le développement ovarien a été expliqué par la présence de son récepteur AMHR-II sur les cellules de la granulosa de l'ovaire fœtal et postnatal (Baarends *et al.*, 1994; di Clemente *et al.*, 1994a).

Par ailleurs, les effets paracrines de l'AMH sur le développement et la fonction des cellules de Leydig dans les testicules sont largement relatés. Ainsi, une relation inverse entre la concentration de l'AMH sérique et celle de la testostérone (T) existe, car lorsque l'AMH est exprimée fortement au cours de la vie fœtale, l'expression de la T est très faible. Par contre, quand l'AMH diminue à la puberté, la T augmente. Après la puberté, l'expression de l'AMH

est considérablement réduite chez les mâles à des niveaux bas similaires à ceux observés chez les femelles (Hudson *et al.*, 1990; Josso *et al.*, 1993; Rey *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996). Le faible niveau de T observé pendant l'enfance est en corrélation avec la rareté des cellules de Leydig fœtales restant après la naissance. Une partie de ces cellules finit par mourir, alors que le reste se différencie à partir des précurseurs mésenchymateux en donnant les cellules de Leydig progénitrices avant la puberté, qui vont se développer en cellules de Leydig immatures, et enfin en cellules de Leydig matures adultes à la puberté. Ces dernières sont la source de la T chez l'adulte (Josso *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 2001). L'effet paracrine de l'AMH sur la différenciation des cellules de Leydig a été identifié après l'observation du phénotype de souris portant des mutations d'*Amh* ou de son récepteur. En effet, les souris mâles surexprimant l'*Amh* de façon chronique possèdent des faibles niveaux de T (Lyet *et al.*, 1995), et une hypoplasie des cellules de Leydig (Behringer *et al.*, 1990). En revanche, les souris invalidées pour l'*Amh* ou l'*Amhr-II* ont une hyperplasie des cellules de Leydig et d'autres anomalies gonadiques (Behringer *et al.*, 1994; Mishina *et al.*, 1996).

Ensuite, des analyses par RT-PCR ont montré que les cellules de Leydig normales expriment l'*Amhr-II* et que la différenciation de ces cellules chez les souris surexprimant l'*Amh* a été bloquée, ce qui conduit à une diminution de 50% et 80% du nombre des cellules de Leydig matures et immatures, respectivement, et donc une augmentation de 74% de cellules mésenchymateuses incluant les cellules de Leydig progénitrices (Racine *et al.*, 1998). En outre, l'AMH exerce un effet négatif sur la stéroïdogénèse, en diminuant l'expression des enzymes stéroïdogéniques dans les testicules de souris transgéniques, notamment les enzymes P450c17 hydroxylase et P450scc, tandis que les protéines impliquées dans le transport du cholestérol dans les mitochondries, comme StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*), sont normales (Josso *et al.*, 1998).

III.4.1.3) Dans la folliculogénèse

Des études sur les rongeurs ont montré que l'expression de l'AMH varie en fonction du stade de développement folliculaire : elle débute dans les cellules de la granulosa des follicules primaires directement après leur différenciation, est maximale dans les follicules préantraux et les petits follicules antraux, puis diminue progressivement pour disparaître au stade de grand follicule antral ou lorsque le follicule devient atrophique (Durlinger *et al.*, 2002a). Cette expression est présente lors des deux étapes régulatrices majeures de la folliculogénèse : le recrutement initial et la sélection du follicule dominant aussi appelée le

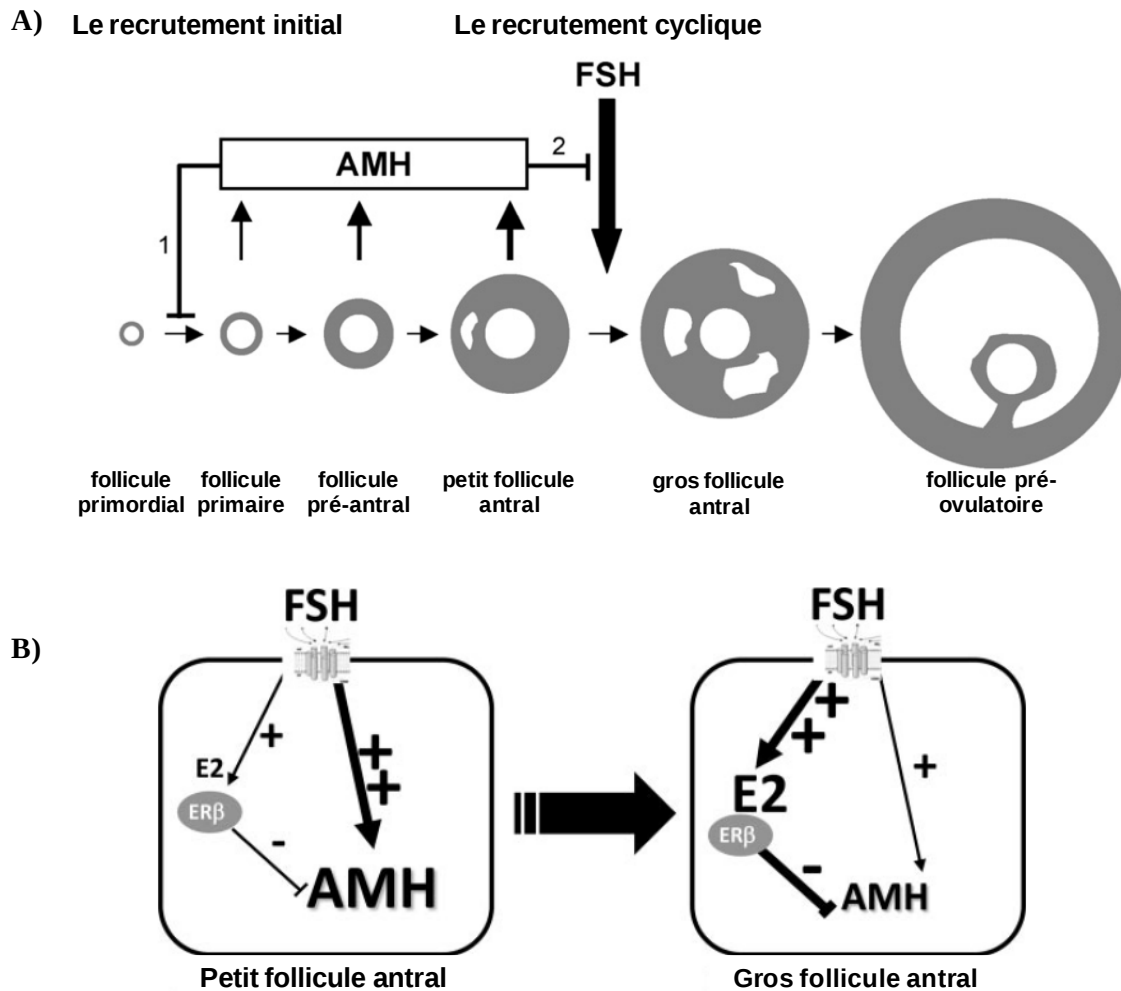


Figure 41 : Régulation hormonale de l'AMH dans l'ovaire. **A)** Mode d'action de l'AMH dans les follicules. Les étapes de la croissance folliculaire sont représentées. L'AMH est produite par les petits follicules en croissance dans l'ovaire postnatal (flèches) et dispose deux sites d'actions. Elle inhibe le recrutement des follicules initiaux (1) et inhibe la croissance dépendante de la FSH et la sélection des follicules pré-antraux et petit antraux (2). **B)** Régulation de l'AMH par la FSH et l'œstradiol (E_2) dans les cellules de la granulosa des petits et grands follicules antraux. Jusqu'au stade de petit follicule antral, la sécrétion d'AMH est stimulée par différents facteurs comme la FSH. En parallèle, la production d' E_2 augmente également sous l'influence de la FSH, mais son effet négatif sur l'expression d'AMH via l'ER β , prédominant dans les follicules en croissance, est surmontée par celle des facteurs de stimulation. Lorsque la concentration d' E_2 atteint un certain seuil dans les gros follicules antraux, le stéroïde est capable d'inhiber totalement l'expression de l'AMH (d'après van Houten *et al.*, 2010; Grynberg *et al.*, 2012).

recrutement cyclique (McGee & Hsueh, 2000). L'analyse des souris invalidées pour l'*Amh* a montré que cette hormone contrôle spécifiquement ces deux étapes (Figure 41A) (Durlinger *et al.*, 2002b; van Houten *et al.*, 2010). En effet, les ovaires des souris (*Amh*^{-/-}) contiennent trois fois plus de petits follicules en phase de croissance que les souris témoins (Durlinger *et al.*, 1999; Visser *et al.*, 2007). En plus, les follicules primordiaux sont plus rapidement recrutés avec, comme conséquence, un stock de follicules prématurément épuisé et des cycles plus précocement arrêtés (Durlinger *et al.*, 1999). D'autre part, des études *in vitro* sur des ovaires murins mis en culture en présence d'AMH ont confirmé l'effet inhibiteur de l'AMH sur le recrutement cyclique (Durlinger *et al.*, 2001).

En plus de la régulation du recrutement de follicules primordiaux, l'AMH peut également réguler la sélection cyclique dépendante de la FSH. L'augmentation de la FSH au cours de chaque cycle conduit à la sélection d'un nombre limité de follicules de la cohorte de petits follicules en croissance. Pour cette sélection cyclique des follicules, un certain seuil de concentration de FSH est nécessaire afin d'éviter le devenir des follicules atrétiques (McGee & Hsueh, 2000). Des études chez la souris et l'homme suggèrent que l'AMH est l'un des facteurs de croissance intra-ovariens contribuant à l'établissement de ce seuil. Chez les souris *Amh*KO, plus des follicules en croissance ont été observés malgré les faibles taux de FSH (Durlinger *et al.*, 1999, 2001). Une analyse détaillée au cours du cycle œstral a révélé que l'augmentation de la FSH est atténuée chez la souris KO pour l'*Amh*. Néanmoins, la sélection de petits follicules antraux dépendante de la FSH a été observée en l'absence d'AMH. En outre, le recrutement de gros follicules préantraux a été identifié chez les souris AMHKO, alors que chez les souris sauvage ces follicules ne sont pas sensibles à la FSH (Visser *et al.*, 2007). Ainsi, l'absence d'AMH rend les follicules plus sensibles à la FSH (van Houten *et al.*, 2010) (Figure 41A). Un rôle de l'AMH dans l'inhibition de la sensibilité FSH a été confirmé dans des cultures *in vitro* de follicules de souris préantraux. Les follicules cultivés en présence de FSH et d'AMH possèdent des diamètres plus petits par rapport à ceux cultivés en présence de FSH seule (Durlinger *et al.*, 2001). En outre, l'AMH inhibe l'augmentation dépendante de la FSH de l'expression du récepteur de LH ainsi que l'activité de l'aromatase dans les cellules de la granulosa d'ovaire immature chez les rongeurs et les porcins (di Clemente *et al.*, 1994b). Récemment, il a été également montré que l'AMH pourrait empêcher l'expression de l'aromatase induite par la FSH, inhibant donc la production d'œstradiol, dans des cultures de cellules de la granulosa de femmes normo-ovulatoires (Grossman *et al.*, 2008).

Chez la femme, dans le liquide folliculaire des petits follicules antraux, une corrélation négative entre le taux d'AMH et de l'E₂ a été observée. En effet, la production de l'E₂ augmente sous l'influence de la FSH, mais son effet négatif sur l'AMH par ER β , n'est pas suffisant par rapport à l'effet des facteurs stimulants. Ce qui suggère indirectement que l'AMH inhibe la production de l'E₂ induite par la FSH (Andersen & Byskov, 2006). Lorsque la concentration de l'E₂ atteint un certain seuil dans les grands follicules antraux, il est capable donc d'inhiber l'expression d'AMH complètement (Figure 41B) (Grynberg *et al.*, 2012).

III.4.1.4) Etudes cliniques

En clinique, le dosage de l'AMH est utilisé depuis longtemps en pédiatrie pour la recherche de tissu testiculaire dans des cas d'ambiguïté sexuelle ou pour le suivi de pubertés précoces. Chez les femmes, le dosage d'AMH intéresse aussi de plus en plus les gynécologues. Le dosage de l'AMH sérique, en permettant l'évaluation de la "réserve ovarienne", permet d'adapter les protocoles aux situations individuelles. De plus, les travaux récents suggèrent que le dosage de l'AMH dans le liquide folliculaire pourrait donner des indications sur la qualité ovocytaire et ainsi aider à la sélection des embryons les plus aptes à s'implanter (de Vet *et al.*, 2002; Seifer *et al.*, 2002; Fanchin *et al.*, 2003, 2007). D'autres études sur les cellules de la granulosa issues d'ovaires polykystiques, cause fréquente d'infertilité, ont mis en évidence une surexpression de l'AMH et de son récepteur dans les cellules de la granulosa (Catteau-Jonard *et al.*, 2008).

III.4.2) Chez les sauropsidés

L'AMH a été aussi étudié chez les oiseaux et les reptiles. En effet, l'AMH de poulet montre une conservation de 25-50% de la séquence des aa par rapport à l'AMH des mammifères, avec une extrémité C-terminale très conservée. Le gène codant l'AMH de poulet comportant 4,2 kb est organisé en cinq exons (Eusèbe *et al.*, 1996; Neeper *et al.*, 1996) et situé sur un autosome (Oreal *et al.*, 1998). L'expression d'AMH chez l'embryon de poulet a été détectée dans les gonades des deux sexes (Oreal *et al.*, 1998). Chez le mâle, les deux canaux de Müller régressent; alors que chez la femelle, seule la gonade gauche se développe en ovaire et le canal de Müller donne lieu à l'oviducte tandis que la gonade droite reste primitif et les canaux de Müller régressent (Smith & Sinclair, 2004). Les mécanismes impliqués dans cette différenciation asymétrique ne sont pas complètement élucidés. La régulation de l'expression d'AMH a été étudiée chez le poulet.

Ainsi, SOX9 ne semble pas être nécessaire pour l'initiation de la transcription d'*AMH*, car l'*AMH* est détectée dans la gonade fœtale avant SOX9 (Oreal *et al.*, 1998). Bien que des éléments de réponse putatifs pour SF1, SOX9 et les œstrogènes ont été trouvés dans le promoteur de l'*AMH* de poulet, leur capacité fonctionnelle doit encore être testée (Oreal *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999).

Chez l'alligator, le gène de l'*amh* a été isolé et séquencé. Ce gène comporte une ORF (*Open Reading Frame*) de 2034 pb codant une protéine de 677 aa et présentant une homologie de 69% avec celle du poulet (Urushitani *et al.*, 2011; Western *et al.*, 1999a). Son expression a été détectée au cours du développement (stade 22) dans les testicules des embryons incubés à une température masculinisante (33°C), au niveau des cellules situées dans la médulla. Ensuite, aux stades (24–25), l'*AMH* s'exprime dans les cellules de Sertoli dans les tubules testiculaires. L'expression de l'*AMH* n'a pas été détectée chez les embryons incubés à une température féminisante (30–34.5°C) (Western *et al.*, 1999a). Comme chez les oiseaux, l'expression de l'*amh* précède celle de *sox9*. Ce qui suggère que, chez les sauropsidés, l'expression de l'*amh* n'est pas régulée par SOX9, et que *sox9* agit tardivement au cours du développement testiculaire (Western *et al.*, 1999a).

III.4.3) Chez les poissons

L'*amh* a été également étudiée au cours de la différenciation des gonades et/ou à l'âge adulte chez les poissons. Le gène est exprimé dans les cellules de Sertoli, souvent en corrélation avec la différenciation testiculaire. Comme les poissons téléostéens ne possèdent pas des canaux de Müller, l'*amh* devait avoir un autre rôle dans le développement testiculaire. L'*amh* a été identifié chez plusieurs espèces de poissons tels que l'anguille japonaise (*Japanese eel*) (Miura *et al.*, 2002), le flet japonais (*Japanese flounder*) (Yoshinaga *et al.*, 2004), le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005), le medaka (*Oryzias latipes*) (Klüver *et al.*, 2007; Shiraishi *et al.*, 2008), le bar (*European Sea bass*) (Halm *et al.*, 2007), la truite arc-en-ciel (*Rainbow trout*) (Baron *et al.*, 2005), le tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Baroiller *et al.*, 2009b; Poonlapdechcha *et al.*, 2011) et le cyprinidé *Squalius alburnoides* (Pala *et al.*, 2008).

Chez le tilapia, l'expression de l'*amh* a été analysée au cours du développement gonadique dans les gonades XX et XY. Cette expression est détectée dans les gonades indifférenciées à des niveaux faibles chez les deux sexes de 5 à 10 jph (*jours post-hatching*). Une augmentation significative des taux d'*amh* est observée après la

différenciation sexuelle dans les gonades mâles à 15 jph, alors que cette expression reste faible et constante dans les gonades femelles. Il est bien de mentionner que cette expression précède celle de *sox9*, ce qui suggère que l'*Amh* a probablement un rôle dans la différenciation testiculaire et que *Sox9* a un rôle dans la formation des tubules testiculaires (Ijiri *et al.*, 2008; Baroiller *et al.*, 2009b), comme c'est le cas chez les oiseaux et les reptiles. Ce profil d'expression a été retrouvé également chez la truite arc-en-ciel (Vizziano *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été constaté que le cerveau du tilapia a une activité enzymatique élevée de l'aromatase qui présente un dimorphisme sexuel avant le début de la différenciation morphologique ovarienne. En outre, la température masculinisante supprime à la fois l'expression du gène *cyp19a1a* gonadique ainsi que l'activité de l'aromatase du cerveau, ce qui suggère qu'une régulation stricte entre les gonades et le système nerveux central peut exister au cours de la différenciation sexuelle chez cette espèce (D'Cotta *et al.*, 2001). Basé sur ces derniers résultats, le profil d'expression de l'*amh* a été étudié récemment simultanément dans le cerveau et les gonades chez le tilapia. Il a été montré que l'expression de l'*amh* est dimorphique avec des niveaux plus élevés dans les cerveaux des individus mâles XY à 10-15 jpf (*jours post-fécondation*), lorsque les gonades sont encore indifférenciées alors que l'*amh* gonadique n'est pas dimorphique. Par la suite, les taux d'*amh* diminuent dans le cerveau alors qu'ils augmentent dans les testicules différenciés. Cette étude indique que le gène de l'*amh* est transcrit déjà dans les cerveaux des individus mâles XY à 10 jpf, suggérant que la différenciation sexuelle pourrait se produire plus tôt dans le cerveau que dans les gonades chez le tilapia (Poonlaphdecha *et al.*, 2011).

L'expression de l'*amh* et son récepteur, *amhr-II*, ont été largement étudiées chez le medaka. En effet, l'*amh* et l'*amhr-II* ne montrent aucune expression sexuelle dimorphique. Ils sont exprimés dans les cellules somatiques dès les stades embryonnaires des deux sexes (Klüver *et al.*, 2007; Shiraishi *et al.*, 2008). Cette expression continue à l'âge adulte chez les mâles et les femelles (Klüver *et al.*, 2007; Morinaga *et al.*, 2007). Donc, l'*amh* et l'*amhr-II* chez le medaka pourraient jouer un rôle dans la formation et le maintien des gonades plutôt que dans la différenciation sexuelle.

Contrairement aux tilapia et medaka, l'expression de l'*amh* chez le poisson zèbre montre un dimorphisme sexuel important chez les juvéniles (von Hofsten *et al.*, 2005; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Wang & Orban, 2007; Schulz *et al.*, 2007). En effet, au cours du développement l'*amh* montre une expression sexuelle dimorphique : exprimée dans les

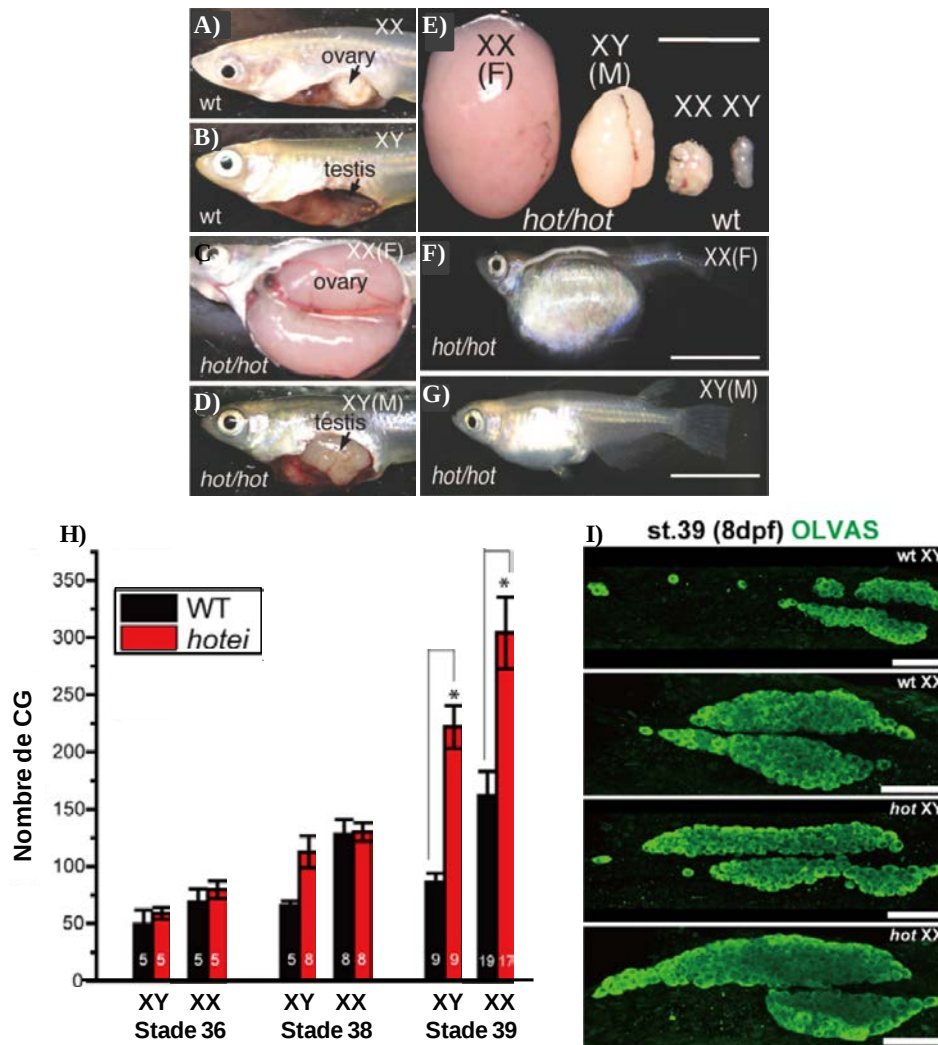


Figure 42 : L'altération de la signalisation de l'AMH provoque une prolifération excessive des CG au cours de la différenciation des gonades chez le poisson medaka. A,B) Gonades contrôles indiquées par des flèches. A) Ovaire B) Testicule. C,D) Gonades de mutants *hot/hot*. C) Cavité abdominale occupée par un ovaire hypertrophique et D) par un testicule élargi. E) Comparaison des gonades isolées des poissons de type sauvage (WT) et mutant *hot/hot* à 6 mois ; de gauche à droite, ovaire XX *hot/hot*, testicule XY *hot/hot*, ovaire XX contrôle et testicule XY contrôle (Barres = 10 mm.) F,G) Phénotypes des femelles et mâles adultes mutants *hot/hot*. H) Nombre total de CG dans les embryons WT et mutant *hotei* au cours de la différenciation des gonades. I) Vues ventrales de gonades WT et mutant *hotei* au stade 39 où le nombre de CG est significativement élevé. Les CG sont en vert (d'après Morinaga *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2012).

testicules des juvéniles mais pas dans les ovaires (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Wang & Orban, 2007). Par contre, les adultes possèdent une expression d'*amh* chez les deux sexes (von Hofsten *et al.*, 2005; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2007).

Dans les gonades du *Japanese flounder*, l'*amh* présente une expression dimorphique au cours de la différenciation sexuelle : l'ARNm a été détecté seulement dans le testicule. Il est exprimé dans les cellules de Sertoli entourant les spermatogonies mais pas les spermatocytes ni les spermatozoïdes, ce qui suggère l'implication de l'AMH dans la spermatogenèse (Yoshinaga *et al.*, 2004). Par ailleurs, chez le pejerrey (*O. bonariensis*), un poisson téléostéen ayant une détermination du sexe dépendante de la température, l'*amh* montre une expression plus élevée à une température masculinisante (26°C) qu'à une température féminisant (17°C) au cours de la différenciation des gonades suggérant qu'il a un rôle fondamental dans la différenciation testiculaire (Fernandino *et al.*, 2008a).

Récemment, chez le medaka, la mutation *hotei* dans le gène codant le récepteur *amhr-II* (Y390C), inhibant la fixation de l'AMH sur son récepteur, conduit à des gonades hypertrophiées dans les deux sexes (Figure 42). Cette hypertrophie résulte de la prolifération excessive des CG. Celles-ci entrent précocement en méiose chez les mâles. En plus, la moitié des mâles XY subit une inversion sexuelle mâle-femelle, accompagnée d'une expression de l'aromatase dans les cellules somatiques de la gonade (Morinaga *et al.*, 2007). Enfin, pour bien comprendre le mécanisme cellulaire qui sous-tend ce phénotype mutant chez le medaka, Nakamura *et al.* (2012) ont constaté que la voie de signalisation d'AMH est nécessaire pour réguler la prolifération des CG dès le début de la différenciation des gonades. La perte de ces signalisations conduit à une hyperprolifération. L'hormone régule les CG mitotiquement actives et capables de s'auto-renouveler. Par ailleurs, l'inversion sexuelle mâle-femelle de ces mutants n'est pas une conséquence directe de la signalisation d'AMH dans les cellules de soutien, mais elle est médiée par les CG (Nakamura *et al.*, 2012a).

L'AMH n'a été jamais étudiée chez les amphibiens.

IV) Développement gonadique en absence des cellules germinales

Cette partie fait la synthèse des études réalisées jusqu'à présent sur le développement gonadique sans CG chez les vertébrés. Tout d'abord, je présenterai dans cette partie le gène *Vasa*, souvent utilisé comme marqueur de la lignée germinale chez différents organismes. Ensuite, j'évoquerai les différentes méthodes utilisées afin d'éliminer les CG et décrirai l'effet de cette élimination sur le développement gonadique.

IV.1) Généralités sur la lignée germinale

Chez les organismes qui se reproduisent de façon sexuée, l'information génétique est transmise d'une génération à l'autre grâce aux CG. Ces cellules se séparent des cellules somatiques au cours du développement embryonnaire et apparaissent sous la forme d'un petit nombre de CGP, qui sont les progéniteurs des gamètes, hors de la future gonade (Wylie, 1999; Starz-Gaiano & Lehmann, 2001). Ces CGP entreprennent ensuite une longue migration à travers les territoires extra-embryonnaire et embryonnaire, afin d'arriver aux crêtes génitales. Lors de cette migration, puis dans la gonade, elles prolifèrent activement (Saffman & Lasko, 1999; Ewen & Koopman, 2010). Puis, les CGP se différencient en CG, qui deviennent des ovogonies ou des spermatogonies lors de la différenciation sexuelle des individus (Wylie, 1999; Ewen & Koopman, 2010). Les CG entrent alors dans les processus complexes de l'ovogenèse ou de la spermatogenèse comprenant une phase de divisions mitotiques et une phase de division méiotique, pour aboutir à la formation des gamètes.

IV.2) VASA

Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), la formation et la différenciation des CGP sont contrôlées par des mécanismes moléculaires complexes impliquant un ensemble de gènes, dont *vasa*, *nanos* ou *tudor* (Saffman & Lasko, 1999). L'un des déterminants majeurs de la lignée germinale est le gène *vasa* (Hay *et al.*, 1988; Lasko & Ashburner, 1988). Ce gène est très conservé au cours de l'évolution et de nombreux orthologues ont été caractérisés dans tout le règne animal depuis les invertébrés diploblastiques jusqu'aux vertébrés mammifères. Nous pouvons citer par exemple le gène *CnVas* chez *Hydra magnipapillata*, *vas* chez *Danio rerio*, *olvas* chez *Oryzias latipes*, *sb-vasa* chez *Dicentrarchus labrax*, *Xvlg-1* chez *Xenopus laevis*, *vasa* chez *Rana rugosa*, *Axvh* chez *Ambystoma mexicanum*, *CVH* chez *Gallus gallus*, *Mvh* chez *Mus musculus*, *VASA* chez *Homo sapiens* (Busse & Séguin, 1993; Komiya *et al.*, 1994; Ikenishi

et al., 1996; Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997; Shinomiya *et al.*, 2000; Tsunekawa *et al.*, 2000; Toyooka *et al.*, 2000; Castrillon *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 2001; Bachvarova *et al.*, 2004; Gustafson & Wessel, 2010; Saotome *et al.*, 2010; Blázquez *et al.*, 2011).

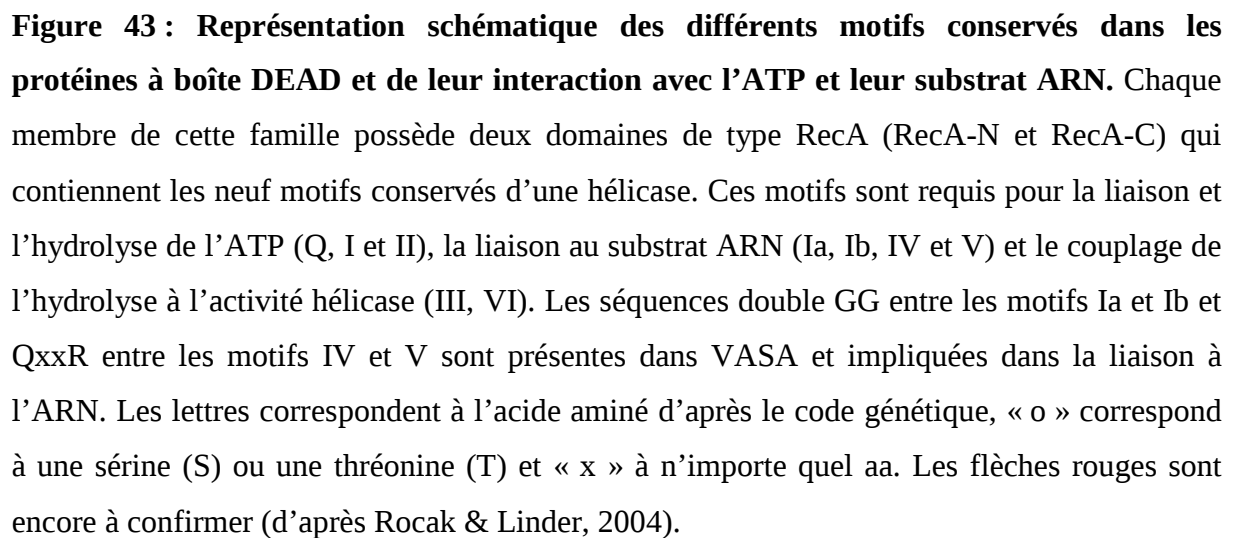
Chez de nombreux organismes tels que la drosophile, le xénope, le poisson zèbre et le poulet, les CGP sont différenciées dès les premiers stades embryonnaires par la localisation de déterminants maternels (ARNm et protéines) dans le cytoplasme germinale de l'embryon ; on parle alors de modèle préformiste. Chez ces espèces, *vasa* semble être l'un des déterminants de la lignée germinale. Chez les mammifères et les amphibiens urodèles, les CGP se différencient plus tardivement, grâce à des interactions cellulaires et des signaux émis par les cellules somatiques voisines, c'est le modèle épigénétique. Dans ce cas, *vasa* semble n'avoir qu'un rôle mineur dans la mise en place des CG (Wylie, 1999, 2000; Extavour & Akam, 2003).

L'expression de *vasa* dans les CG, son rôle dans leur développement et sa forte conservation au cours de l'évolution, font de *vasa* un marqueur de choix pour l'étude de la lignée germinale.

IV.2.1) Généralités sur la famille à boîte DEAD : motifs conservés et fonctions associées

VASA appartient à la famille des protéines à boîte DEAD (Linder *et al.*, 1989) au sein de la superfamille des nucléoside triphosphatases (NTPases) impliquées dans le métabolisme de l'ARN et de l'ADN (Gorbalenya *et al.*, 1989). Les membres de cette superfamille ont un rôle supposé d'hélicase de l'ARN ATP (*Adenosine triphosphate*) -dépendante ce qui signifie qu'elles déroulent les structures secondaires des molécules d'ARN. Elle jouent un rôle essentiel dans la vie des cellules, interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'épissage de l'ARN, l'assemblage des ribosomes, l'initiation de la traduction, et jouent un rôle important dans l'embryogenèse, la croissance et la division cellulaire (Linder *et al.*, 1989; Schmid & Linder, 1992). La famille des protéines à boîte DEAD comprend plusieurs groupes tels que eIF-4A (*eukaryotic Initiation Factor*) impliqué dans l'initiation de la traduction, p68 participant à la croissance et à la division cellulaire, PL10 intervenant dans la spermatogenèse ou encore VASA impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de gènes responsables de la formation et la différenciation des CG (Schmid & Linder, 1992).

Le regroupement des protéines dans cette famille est basé sur leur homologie pour la séquence Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D) (Schmid & Linder, 1992). Le facteur d'initiation de la traduction "eIF-4A" des mammifères sert de référence (Pause & Sonenberg, 1992). C'est à partir d'eIF-4A que les fonctions des protéines à boîte DEAD ont été étudiées. Chaque



membre de cette famille possède deux domaines de type RecA (RecA-N et RecA-C) qui contiennent tous les motifs conservés d'une hélicase (Gorbalenya & Koonin, 1993), ainsi que deux extrémités amino-et carboxy terminales de longueur variable de 21 à 505 et 34 à 373 résidus, respectivement.

L'alignement des séquences peptidiques des protéines à boîte DEAD de différentes espèces révèle neuf motifs de séquences consensus conservées avec très peu de variations (Linder, 2006; Gustafson & Wessel, 2010) (Figure 43). Ces motifs conservés sont bien caractérisés et leur fonction ainsi que leurs interactions intramoléculaires sont de mieux en mieux comprises. A l'inverse des motifs conservés, les séquences qui séparent ces différents motifs sont divergentes mais leurs longueurs sont relativement bien conservées (Gorbalenya & Koonin, 1993). Dans l'ensemble, ces motifs incluent des résidus conservés impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de NTP, équivalents aux boîtes Walker A et Walker B retrouvées dans beaucoup d'ATPases (Smith & Rayment, 1996). Par ailleurs, ces motifs ne sont pas indépendants, car il existe de fortes coopérations entre-eux par des liaisons intramoléculaires qui peuvent évoluer lors de l'interaction avec l'ATP ou l'ARN. Ces motifs sont requis pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Q, I et II), la liaison au substrat ARN (Ia, Ib, IV et V) et le couplage de l'hydrolyse à l'activité hélicase (III, VI). Une séquence double GG conservée fait partie du domaine I et réside dans une structure en boucle entre les motifs Ia et Ib. Une séquence QxxR conservée entre les motifs IV et V a aussi été identifiée dans la famille des protéines à boîte DEAD. Ces deux séquences sont impliquées dans la liaison à l'ARN (Linder & Lasko, 2006). L'ensemble de ces activités et les changements conformationnels lors de ce processus enzymatique aboutissent à une activité hélicase permettant le remodelage des complexes ribonucléoprotéiques (Figure 43).

Le motif Q (G-a-x-x-P-o-x-x-Q) est le motif dont la découverte est la plus récente. L'équipe de Patrick Linder est à l'origine de l'identification de ce motif par la caractérisation d'une glutamine (Q) caractérisée comme essentielle *in vivo*, dans les protéines à boîte DEAD (Tanner *et al.*, 2003). Le motif I, également connu comme le motif Walker A, est composé d'une séquence consensus (AxTGxGKT) caractéristique de la famille à boîte DEAD et se retrouve dans certaines ATPases, GTPases et hélicases à ADN (Gorbalenya *et al.*, 1989). Le motif II (DEAD) correspond au domaine Walker B, présent dans toutes les ATPases et caractérisé en 1982 par Walker (Walker *et al.*, 1982). Le premier acide aspartique (D) et le glutamate (E) présents dans ce motif sont ultra-conservés. Ils interagissent avec l'ion magnésium complexé avec l'ATP, ce qui pourrait entraîner un changement conformationnel du core de l'hélicase et le

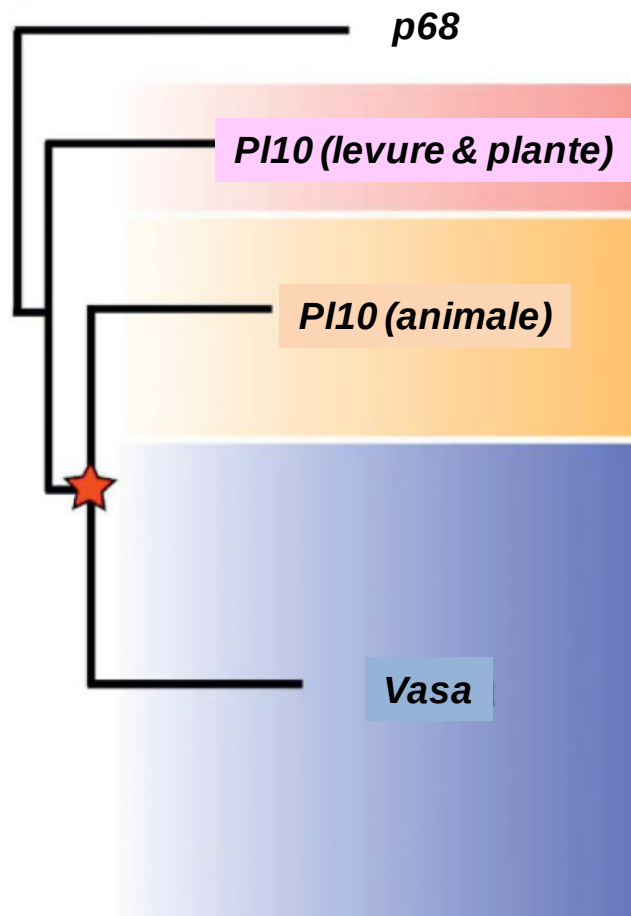


Figure 44 : Relation phylogénétique entre les gènes *Vasa*, *Pl10* et *p68*. L'étoile indique la répartition évolutive entre *Vasa* et *PL10* gène (d'après Gustafson & Wessel, 2010).

rapprochement du deuxième acide aspartique (D) du motif II avec l'histidine (H) conservée du motif VI (Dillingham *et al.*, 1999; Story *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2004; Cordin *et al.*, 2006). La fonction du motif III, composé de (SAT), n'est pas très bien définie, alors que le motif IV, composé de neuf résidus avec une séquence consensus V/L/I-V/I-F et des résidus chargés de part et d'autre (Gorbalenya & Koonin, 1993; Banroques *et al.*, 2008), est requis pour la liaison à l'ARN pour la protéine eIF4A (Caruthers & McKay, 2002). Le motif V, dont la séquence consensus est TDVuARGID (où u correspond à une Alanine ou une Glycine) joue un rôle dans la liaison à l'ARN de façon conjointe avec les motifs auxiliaires Ia, possédant PTRELA, Ib composé de TPGR et IV (Cordin *et al.*, 2006). Le motif VI, caractérisé par la séquence consensus (HRxGRxGR) est localisé à l'interface des deux domaines structurellement fonctionnels composés d'un côté par les motifs (Q, I, Ia, Ib et II) et de l'autre par les motifs (IV, V et VI) chez les hélicases DEAD. Ce motif est requis pour l'activité ATPase et par conséquent joue un rôle dans la liaison à l'ARN (Pause *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 2002).

IV.2.2) Origine du gène *vasa*

Des données phylogénétiques comparatives suggèrent que l'ancêtre du gène *Vasa* provient d'une duplication d'un ancêtre commun avec le gène *Pl10* appartenant à la famille à boîte DEAD, survenue au cours de l'évolution des métazoaires (Mochizuki *et al.*, 2001). Cette séparation aurait eu lieu avant l'apparition des éponges (diploblastiques) mais après la divergence des champignons et des plantes. Alors que les animaux ont à la fois les gènes *Vasa* et *Pl10*, les plantes et les champignons possèdent seulement le gène *Pl10* (Leroy *et al.*, 1989; Mochizuki *et al.*, 2001) (Figure 44).

IV.2.3) Structure moléculaire de la protéine et du gène

La protéine VASA est caractérisée, comme les autres membres de sa famille, par les neuf motifs conservés et situés dans deux domaines fonctionnels. Le domaine I (domaine N-terminal) contient six motifs : les motifs Q et Walker A nécessaires pour la liaison de l'ATP et de l'ARN, les motifs Ia et Ib qui, conjointement avec des motifs IV et V, sont responsables de la liaison à l'ARN, le motif Walker B important pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, et le motif III, qui peut agir en liant l'ATPase et l'activité hélicase de la protéine. Le domaine II (domaine C-terminal) contient les motifs IV, V, et VI, qui coordonnent d'une part l'ATPase et le déroulement de l'ARN et d'autre part l'ATPase et la liaison de l'ARN. Les séquences double GG entre les motifs Ia et Ib et QxxR entre les motifs IV et V sont présentes dans

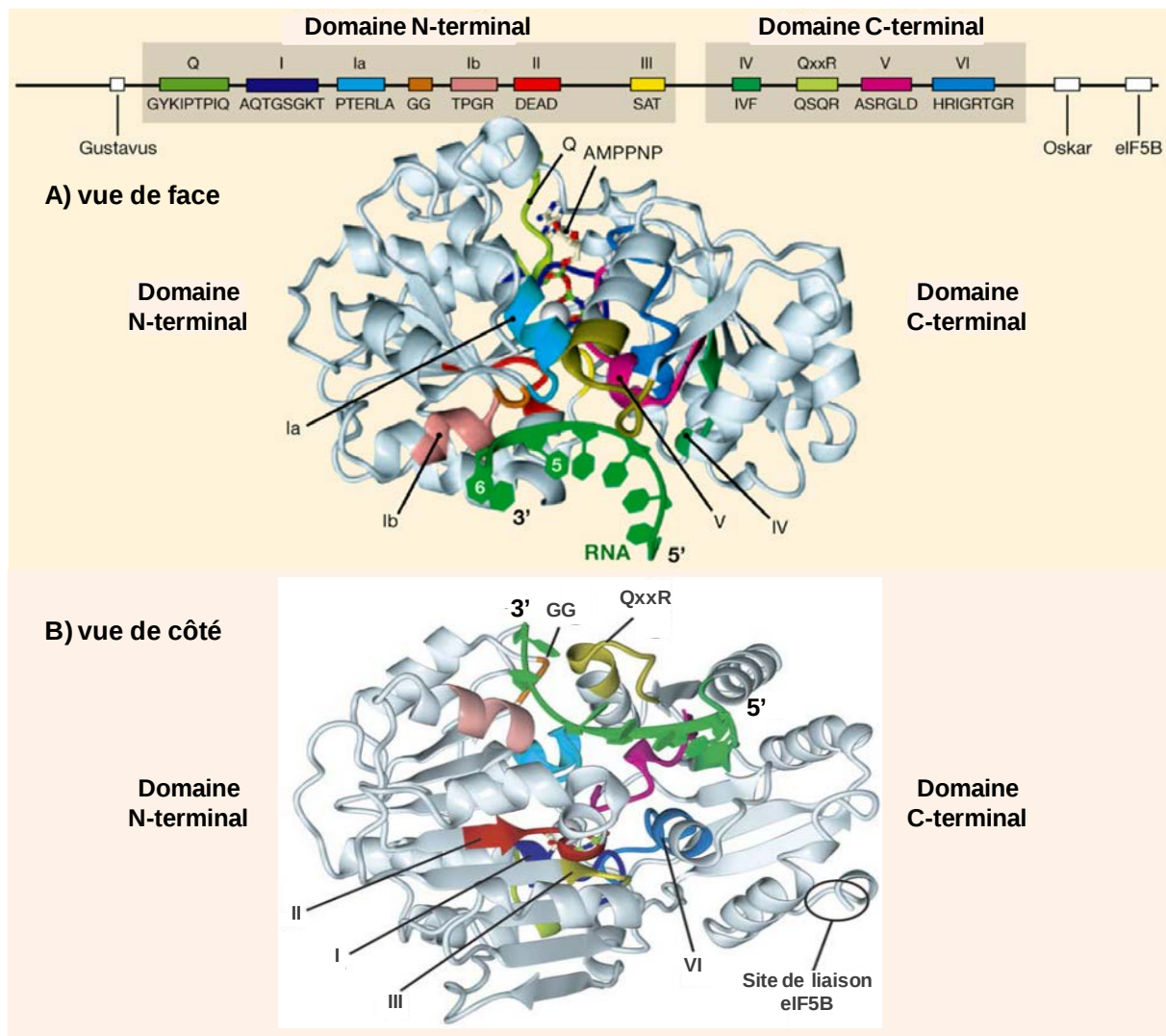


Figure 45 : Structure générale de la protéine Vasa et modélisation moléculaire tridimensionnelle du complexe Vasa/ARN/AMPPNP. Les neuf motifs conservés par toutes les protéines à boîte DEAD et distribués dans les domaines N-terminal et C-terminal. Les domaines qui interviennent dans les interactions avec d'autres partenaires (tels que Gustavus, Oskar et eIF5B) se situent en dehors de ces régions. **A)** vue de face et **B)** vue de côté. La structure de la protéine Vasa liée à un analogue de l'ATP hydrolysé (AMPPNP) et à un substrat ARN simple brin montre clairement le virage induit dans la molécule d'ARN entre les nucléotides U5 et U6. Tous les motifs sont indiqués (d'après Sengoku *et al.*, 2006; Linder & Lasko, 2006).

VASA et impliquées dans la liaison à l'ARN (Linder & Lasko, 2006; Gustafson & Wessel, 2010) (Figure 45). Par ailleurs, en plus de sa fonction d'hélicase, VASA a une fonction de liaison à l'ARN. En effet, son extrémité N-terminale est riche en glycine et très hydrophile, comme pour de nombreuses protéines fixatrices d'ARN (*RNA-binding proteins*) (Ghisolfi *et al.*, 1992). De même, l'extrémité C-terminale est riche en résidus acides, glutamate ou aspartate, propriété retrouvée chez plusieurs protéines transporteuses d'acides nucléiques simple brin (Hay *et al.*, 1988). L'activité de liaison à l'ARN permet de faciliter ou de bloquer les interactions avec des facteurs de trans-régulation ou encore de fournir des signaux de localisation pour le transport des ARNm dans des régions déterminées des cellules où ils pourront être traduits (Siomi & Dreyfuss, 1997).

Chez la drosophile, le gène *vasa* est formé de 7 exons et 6 introns (5 petits de 53, 58, 57, 63 et 70 pb et 1 grand de 3,5 Kb) (Hay *et al.*, 1988), alors que, chez le poisson zèbre, il s'étend sur 25 Kb et comprend 27 exons qui varient entre 27 et 729 pb (Krøvel & Olsen, 2002). De même, chez le bar européen *Dicentrarchus labrax*, *sb-vasa* contient un ORF de 1911 pb, flanqué des deux régions non codantes à ses extrémités 5' et 3'. La région 5'-UTR comprend 42 pb et la région 3'-UTR 325 pb ainsi que le signal de polyadénylation et la queue polyA. La séquence déduite de l'ORF code pour une protéine de 637 aa qui possède tous les motifs spécifiques des protéines à boîte DEAD (Blázquez *et al.*, 2011). Par ailleurs, chez *Rana rugosa*, l'ADNc *vasa* possède un ORF de 2211 pb codant pour une protéine de 736 aa (Saotome *et al.*, 2010). Récemment, l'ADNc de *Vasa* chez le wallaby et l'ornithorhynque a été cloné. Chez le wallaby il comporte un ORF de 2181 pb comprenant 21 exons, comme chez la souris et l'homme, et codant une protéine de 726 aa, alors qu'il comporte un ORF de 2232 pb établi sur 22 exons, avec un exon supplémentaire (3b) après l'exon 3, et codant une protéine de 743 aa chez l'ornithorhynque (Hickford *et al.*, 2011).

IV.2.4) Régulation de l'expression de *vasa* et localisation subcellulaire

Généralement, l'expression de VASA (ARNm et protéine) est maximale au début de la gamétogenèse, dans les gonies (ovogonies ou spermatogonies) et les cytes en début de méiose (ovocytes prévitellogéniques ou spermatocytes). L'expression diminue puis disparaît dans les CG en maturation (ovocytes en vitellogenèse ou spermatides, ovocytes matures ou spermatozoïdes). Ce profil d'expression est rencontré chez la majorité des organismes étudiés, comme par exemple la drosophile, le criquet *Schistocerca gregaria*, la planaire *Dugesia japonica*, les poissons medaka et tilapia, le xénope ou encore le poulet (Lasko & Ashburner,

1988; Komiya *et al.*, 1994; Shibata *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000; Shinomiya *et al.*, 2000; Tsunekawa *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002). A l'inverse, chez *Caenorhabditis elegans*, les ARN *glh-1* sont détectés spécifiquement dans les cellules de la lignée germinale depuis les premières cellules qui se divisent par mitose jusqu'aux gamètes (Gruidl *et al.*, 1996).

Chez les espèces de vertébrés et d'invertébrés où la différenciation des CG dépend de facteurs maternels, l'expression de *vasa* qui est absente dans les ovocytes vitellogéniques, reprend dans les ovocytes matures avant la fécondation afin que les produits du gène (protéines et ARNm) soient transmis à l'embryon lors de la fécondation. Les produits de *vasa* synthétisés dans l'ovocyte et parfois transmis par les cellules nourricières, comme chez la drosophile, sont regroupés dans des structures granuleuses dans le cytoplasme périnucléaire de l'ovocyte. Elles correspondent aux précurseurs du plasme germinal des embryons. Ces structures sont appelées granules polaires chez la drosophile, granules P chez *Caenorhabditis* et ont été décrites chez l'hydre comme "une accumulation de transcrits de *vasa* dans l'œuf non fécondé" ou encore comme "des structures granulo-fibreuses associées à des mitochondries dans les ovocytes" chez le poulet (Hay *et al.*, 1988; Gruidl *et al.*, 1996; Tsunekawa *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 2001). Chez le poisson zèbre et la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, les transcrits maternels de *vasa* sont détectés dans les œufs fécondés (Olsen *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1997; Shinomiya *et al.*, 2000) et sont localisés dans des structures similaires aux granules polaires (Knaut *et al.*, 2000).

Différentes régions régulatrices du gène ont été mises en évidence. Chez la drosophile, il a été démontré qu'une région régulatrice de 40 pb située dans la zone promotrice de *vasa* entre les positions -57 et -96 pb est nécessaire et suffisante pour contrôler l'expression spécifique de *vasa* dans les CG pendant l'ovogenèse et dans le cytoplasme germinal durant l'embryogenèse. Ceci suggère que des mécanismes cellulaires similaires régissent l'expression de *vasa* dans les CG aux stades adulte et embryonnaire (Sano *et al.*, 2002). De même, un élément de localisation dans la région 3'UTR des séquences des gènes *vasa* du poisson zèbre et du xénope contrôle la localisation des ARNm de *vasa* dans les granules polaires (Knaut *et al.*, 2000).

Chez la drosophile, un épissage alternatif de *vasa* aboutit à la formation de trois formes de transcrits, la forme majeure de 2 Kb et deux formes mineures de 4 Kb et 2 Kb environ. La forme majeure et la forme mineure de 4 Kb sont particulièrement abondantes chez les femelles adultes et les jeunes embryons de 0 à 3 heures après fécondation alors que la troisième forme est plus intensément exprimée dans les embryons de 6 à 24 heures (Lasko & Ashburner, 1990). Chez le poisson tilapia (*Oreochromis niloticus*), l'épissage alternatif donne

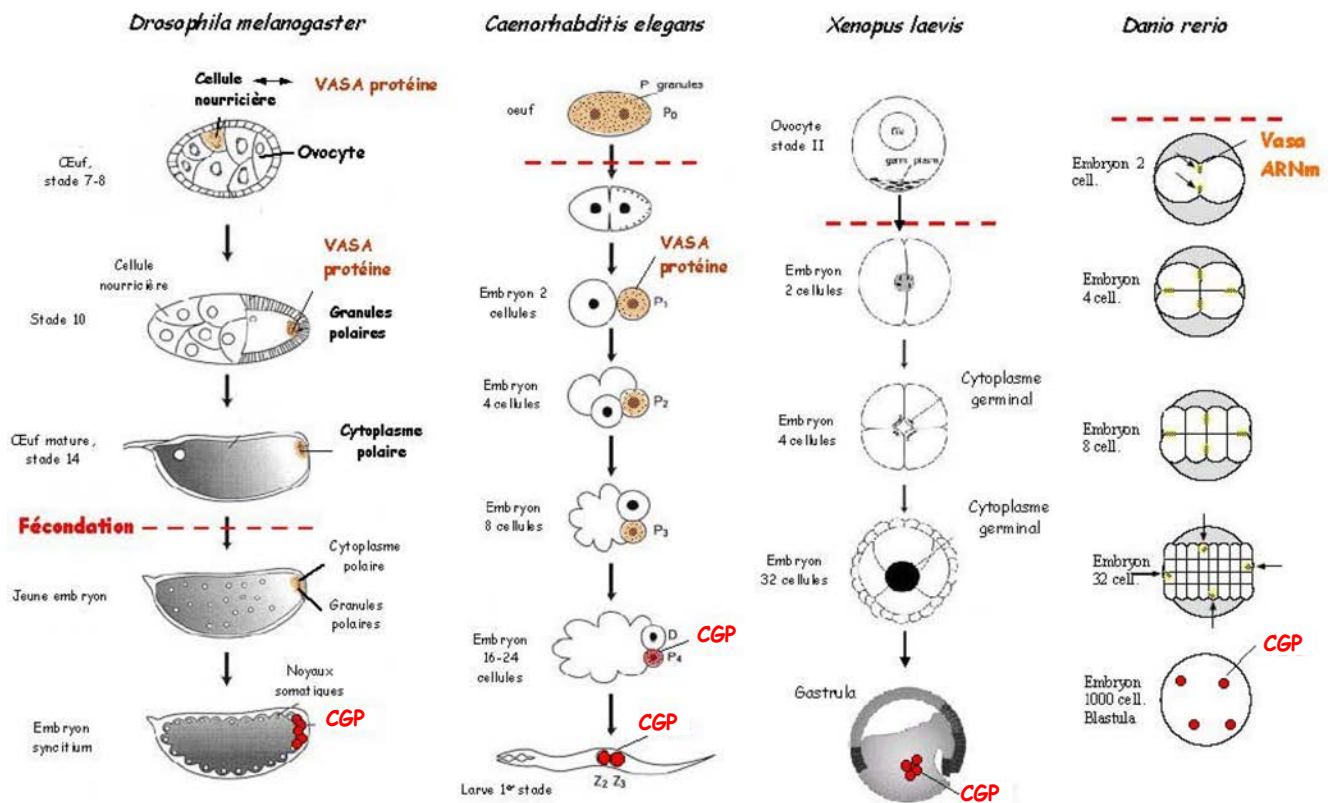


Figure 46 : Localisation des ARNm et des protéines de Vasa, ainsi que des CGPs au cours du développement embryonnaire. Sont illustrés la drosophile, *C.elegans*, le xénope et le poisson zèbre (d'après Saffman & Lasko, 1999; Yoon *et al.*, 1997).

deux formes d'ARNm de *vasa* (*vas* et *vas-s*). *vas-s* est une forme raccourcie de *vas* dans sa région N-terminale. L'expression des deux formes est dépendante du sexe et du stade de développement des poissons. La forme *vas-s* domine pendant l'ovogenèse alors que *vas* est prédominante au cours de la spermatogenèse (Kobayashi *et al.*, 2002). De même, il a été montré que chez le poisson zèbre, deux variants de *vas* existent après un épissage alternatif. Alors que le variant long de *vas* (*vas-l*) contient tous les exons, le variant court (*vas- δ 4*) est dépourvu de l'exon 4 (Krøvel & Olsen, 2004). En plus, il a été signalé que *vas-l* est dix fois plus abondante dans les ovaires par rapport aux testicules (Bárfai & Orbán, 2003).

IV.2.5) VASA et la détermination de la lignée germinale

IV.2.5.1) Chez la drosophile et le nématode (*Caenorhabditis elegans*)

Chez la drosophile, la protéine VASA d'origine maternelle est localisée, dès les premiers stades du développement, dans le cytoplasme polaire (le cytoplasme germinale) dans la partie postérieure des embryons (Hay *et al.*, 1988; Lasko & Ashburner, 1988; Hay *et al.*, 1990; Liang *et al.*, 1994) puis dans les CGP lors de leur formation (Hay *et al.*, 1988). En effet, les CG se forment tôt au cours du développement, au pôle postérieur de l'embryon où VASA d'origine maternelle est localisée. Au stade 10, les CG migrent au sein de l'embryon et rejoignent les dérivés du mésoderme composés de précurseurs des cellules somatiques (PCS). Ensuite, les CG s'associent avec les PCS et fusionnent afin de former les deux gonades embryonnaires (Figure 46) (Richardson & Lehmann, 2010). Durant la migration, les CG deviennent transcriptionnellement actives et déclenchent la transcription zygotique de *vasa* (van Doren *et al.*, 1998).

Durant l'ovogenèse, *vasa* est nécessaire à l'assemblage au pôle postérieur de l'ovocyte, des granules polaires précurseurs du cytoplasme germinale. L'assemblage des granules polaires s'effectue d'abord dans les cellules nourricières (Hay *et al.*, 1988) qui transmettent ensuite l'essentiel de leur cytoplasme aux ovocytes grâce à des ponts cytoplasmiques situés dans la partie postérieure des ovocytes. VASA s'accumule alors dans la partie postérieure des ovocytes où les granules polaires seront assemblés. Une fois localisée, VASA a une fonction d'accrochage et de transport des ARNm pour localiser les autres composants des granules polaires dans la partie postérieure de l'ovocyte. Ainsi, chez un individu portant un allèle hypomorphique *vasa*^{PD} pour lequel le gène *vasa* est peu exprimé, les granules polaires ne sont

pas assemblés ou pas localisés. Cela donne des embryons qui ne parviennent pas à former la lignée germinale et qui ont des délétions de segments abdominaux (Hay *et al.*, 1990).

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, la protéine GLH-1 (*germ line helicase-1*), orthologue de VASA, est également un déterminant de la lignée germinale et elle est spécifiquement localisée dans les granules P, équivalent au cytoplasme germinal. Pendant les premières divisions embryonnaires, GLH-1 et les granules P ségrégent de façon asymétrique jusqu'à se retrouver dans la cellule P4 fondatrice de la lignée germinale (Roussell & Bennett, 1993; Gruidl *et al.*, 1996; Kuznicki *et al.*, 2000) (Figure 46).

IV.2.5.2) Chez les amphibiens

Chez les anoues, Vasa a été bien décrite. Par exemple, chez le xénope, la protéine Xvlg-1 (*Xenopus vasa-like gene-1*) interviendrait dans la traduction d'ARNm essentiels à la détermination des CG (Ikenishi & Tanaka, 1997, 2000). Ceci a été démontré grâce à l'analyse d'une protéine XVLG-1 dont l'activité a été perturbée par l'injection *in vivo* d'un anticorps anti-Xvlg-1 empêchant la différenciation des CGP au stade de têtard (Ikenishi & Tanaka, 1997). De plus, il a été montré que Xvlg-1 s'exprime dans le cytoplasme des ovocytes aux stades I-III, ainsi que dans les tissus somatiques dont les somites, la moelle épinière et la notochorde chez les embryons après le stade blastula (Ikenishi & Tanaka, 2000). Par ailleurs, chez *Xenopus tropicalis*, les résultats des immunoblots réalisés avec un anticorps monoclonal dirigé contre Xvlg-1, ont montré, que cette protéine s'exprime exclusivement dans les testicules et les ovaires adultes au niveau des gonies et gonocytes, ainsi que dans les CGP au stade de têtard (Komiya *et al.*, 1994) (Figure 46). Chez *Rana rugosa*, vasa ne s'exprime que dans les gonades quel que soit le sexe. Cette expression ne montre pas de dimorphisme sexuel au cours de la détermination du sexe, mais elle devient plus élevée dans l'ovaire par la suite (Saotome *et al.*, 2010). De même, les études par HIS ont montré que *Rlvlg*, homologue de vasa chez *R. ridibunda*, *R. lessonae* et *R. esculenta*, s'exprime dans les CG et pas dans les cellules folliculaires dans les ovaires. Il s'exprime dans le cytoplasme des ovocytes aux stades I-III. Alors que dans les testicules, *Rlvlg* est exprimé dans les spermatogonies et les spermatocytes I, mais pas dans les spermatocytes II, ni les spermatides, ni les cellules somatiques (Marracci *et al.*, 2007).

Chez les urodèles, Bacharova *et al.* ont analysé *Axvh* chez l'axolotl *Ambystoma mexicanum*. Les analyses par RT-PCR sur les tissus adultes révèlent une expression d'*Axvl* seulement dans le testicule et l'ovaire. Au cours du développement embryonnaire, l'ARN *Axvh* est présent

jusqu'au stade gastrula, et diminue progressivement à partir du stade 12, avec une expression très faible au stade 40. Cela reflète probablement l'origine maternelle de l'ARN *Axvh* chez l'axolotl, car il est présent dans toutes les parties disséquées de l'embryon du stade 8 au stade 35, et aucune expression spécifique n'a pu être détectée par HIS aux mêmes stades. Au stade 40, l'ARN *Axvh* est principalement détecté par RT-PCR dans la région postérieure et dorsale de l'embryon, puis dans le tronc postérieur contenant les CG au stade 45. Par HIS, une expression spécifique d'*Axvh* a été observée à un faible niveau dans les CGP localisées dans la partie dorso-latérale au stade 38, puis cette expression devient plus forte dans les CG des gonades bien formées au stade 45 (Bachvarova *et al.*, 2004).

IV.2.5.3) Chez les poissons

Chez les poissons, les ARN maternels du gène *vasa* du poisson zèbre sont localisés précisément le long des deux premiers plans de clivage des blastomères de l'embryon (Yoon *et al.*, 1997; Krøvel & Olsen, 2002) puis ils se condensent dans 4 blastomères au stade 32 cellules et restent ainsi localisés par le jeu de divisions cellulaires asymétriques où seule une cellule fille hérite les ARNm de *vasa* (Figure 46). Ces agrégats d'ARNm forment des granules denses correspondant au cytoplasme germinale (Knaut *et al.*, 2000). Au stade 1000 cellules, les 4 groupes se condensent et sont incorporés aux CGP en formation (Yoon *et al.*, 1997; Knaut *et al.*, 2000). Une ablation des 4 zones de cytoplasme contenant les transcrits *vasa* empêche la formation des CGP induisant une réduction sévère du nombre de CG (Hashimoto *et al.*, 2004). A l'inverse, la protéine Vasa est largement répartie dans tout l'embryon du poisson zèbre au début de son développement, et dès la gastrulation et la formation des CGP, Vasa se localise spécifiquement dans les CG (Knaut *et al.*, 2000). Des mécanismes post-transcriptionnels de « protection/dégradation » agissent sur les ARNm et les protéines de Vasa du poisson zèbre permettant leur maintien dans les CGP et leur dégradation dans les cellules somatiques. En effet, avant la formation des CGP, la régulation se fait par l'enrichissement de quatre agrégats de cytoplasme germinale en ARNm maternels, comme décrit ci-dessus. Mais après le début de l'expression zygotique, les ARNm et les protéines Vasa sont maintenus dans les CGP et sont spécifiquement dégradés dans le soma (Wolke *et al.*, 2002).

De même, chez le medaka *Oryzias latipes*, l'expression spatio-temporelle des transcrits *olvas* a été observée par l'HIS dans les gonades et les embryons. Ainsi, les transcrits *olvas* ont été exclusivement détectés dans le cytoplasme des CG dans le testicule et l'ovaire, et pas dans les cellules somatiques des gonades. Au cours des premiers stades de développement, chaque

blastomère possède les ARNs maternels d'*olvas*, qui disparaissent au stade gastrula. A la fin de ce stade, une expression spécifique d'*olvas* a été observée uniquement dans les CG. En effet, dans le testicule une forte expression d'*olvas* se trouve au niveau des spermatogonies et spermatocytes I, qui va diminuer dans les spermatocytes II, puis disparaître dans les spermatides ainsi que les spermatozoïdes. Alors que dans les ovaires, les signaux les plus forts de l'ARN *olvas* ont été observés dans le cytoplasme des ovocytes prévitellogéniques de stades II et III. Le signal diminue au cours de la croissance des ovocytes et devient indétectable dans les ovocytes vitellogéniques de stade V (Shinomiya *et al.*, 2000). Le même profil a été détecté chez le tilapia *Oreochromis niloticus* dans les CG au cours de la gamétogenèse, ce qui suggère que *vas* a une fonction différentielle dans la régulation de la progression méiotique des CG femelles et mâles (Kobayashi *et al.*, 2000). Enfin, chez le bar européen *Dicentrarchus labrax*, l'expression temporelle de *sb-vasa* au cours du développement précoce montre des niveaux élevés d'ARNm dans l'œuf non fécondé, qui diminuent au cours du développement larvaire et augmentent à nouveau pendant la période de la prolifération des CG. De plus, des différences de l'expression ont également été détectées, bien avant la différenciation sexuelle et jusqu'à la fin de la première année, avec des niveaux plus élevés chez les femelles. Ces différences dans l'expression démontrent l'implication de *vasa* durant les stades initiaux de la différenciation sexuelle du poisson et de la gamétogenèse, et suggèrent que par son activité hélicase, *vasa* pourrait être impliqué dans la spécification et la différenciation des types cellulaires spécifiques des gonades (Blázquez *et al.*, 2011).

IV.2.5.4) Chez les oiseaux et les reptiles

Chez le poulet, il a été démontré que la protéine CVH a une expression spécifique de la lignée germinale pendant tous les stades du développement. Les analyses immunohistochimiques utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre CVH indiquent que cette protéine est localisée dans le cytoplasme des CGP présumptives de l'embryon jusqu'aux spermatides et ovocytes dans les gonades adultes. En outre, dans les ovocytes, la CVH est principalement localisée dans les structures granulaires entourant le nuage mitochondrial, ce qui indique que la structure cytoplasmique contenant l'expression de CVH représente le précurseur du cytoplasme germinale chez le poulet, confirmant que la lignée germinale de poulet est déterminée par des facteurs maternels du plasma germinale (Tsunekawa *et al.*, 2000).

Lavial *et al.* (2009) ont démontré que la surexpression de CVH dans des cellules souches embryonnaires (CSE) de poulet, combinée à des conditions de culture appropriées, peut

déclencher leur différenciation en cellules exprimant des marqueurs spécifiques de lignée germinale et de la méiose, tels que *Dazl*, *Tudor*, *Nanog* et *Sycp3* ; certaines de ces cellules migrent vers les gonades embryonnaires après la transplantation. De cette étude, il apparaît que *CVH* peut être un facteur clé pour la spécification des CG chez le poulet, mais son rôle exact dans les CGP reste à préciser. En plus de *CVH*, des gènes homologues comme *deadend* (*CDH*) (Aramaki *et al.*, 2007 ; 2009) et *DAZL* (*Deleted in Azoospermia-Like*) (Kito *et al.*, 2010), codant pour des protéines liant l'ARN, peuvent être utilisés comme des marqueurs spécifiques de la lignée germinale (Nakamura *et al.*, 2013). Chez le poulet, *CVH* et *CDH* sont exprimés dans les CG mâles et femelles, alors que *DAZL* ne se trouve pas dans l'ovaire des individus de 2-4 semaines (Kito *et al.*, 2010).

Chez le lézard *Podarcis sicula*, au cours du développement prévitellogénique, l'ovocyte est structurellement et fonctionnellement associé par des ponts intercellulaires avec des cellules folliculaires spéciales appelées cellules piriformes. Ces cellules fonctionnent de manière similaire aux cellules nourricières de la drosophile, mais sont d'origine somatique. Pendant l'ovogenèse chez *P. sicula*, *Vasa* est fortement exprimée dans les ovogonies, mais ces niveaux diminuent dans les ovocytes précoces, avant la différenciation des cellules piriformes. Dans les derniers stades de l'ovogenèse, les niveaux élevés de *Vasa* dans le cytoplasme polaire de l'embryon et dans sa partie postérieure sont en relation avec la fonction nourricière des cellules folliculaires piriformes. Ces observations suggèrent que les cellules d'origine somatique sont engagées dans la synthèse de *Vasa* dans l'ovogenèse chez ce lézard (Maurizii *et al.*, 2009). A contrario, chez la tortue *Trachymys scripta*, ni les ARNs *dazl* ou *vasa* ni la protéine *VASA* ne sont exprimés dans les ovocytes, ce qui suggère l'absence de plasmogonies. En plus, aux stades des somites, les CGP expriment *dazl* dans l'endoderme extra-embryonnaire, ainsi qu'au stade de la gastrulation, les cellules exprimant *dazl* se trouvent dans la fente blastoporale, ce qui indique que les CGP sont générées au niveau de l'équivalent de la ligne primitive comme chez les mammifères. Par ailleurs, les ARN *vasa* sont exprimés dans les cellules somatiques dès les stades de somites jusqu'à la gastrulation, alors que les ARN et les protéines *VASA* sont exprimés dans les CGP de l'embryon plus tard. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que les tortues, contrairement aux autres reptiles et aux oiseaux, utilisent un mode épigénétique de spécification des CG (Bachvarova *et al.*, 2009a, 2009b).

IV.2.5.5) Chez les mammifères

Chez les mammifères, la protéine MVH (*murine vasa homologue*), utilisée comme marqueur des CG chez la souris, est détectée exclusivement dans les CGP juste après la colonisation des crêtes génitales (Fujiwara *et al.*, 1994; Toyooka *et al.*, 2000). Pourtant, les premières cellules présentant une forte activité phosphatase alcaline, caractéristique des CG des mammifères, sont observées dès 7,25 jpc, au moment de la gastrulation. Ensuite, à 8 jpc, ces cellules entament la migration vers le mésoderme à l'arrière de l'embryon puis à travers l'endoderme pour coloniser les ébauches génitales à 10.5-11.5 jpc. Dans les ovaires adultes, MVH est localisée dans le cytoplasme des ovocytes en croissance, mais pas dans les cellules folliculaires. Ainsi, l'expression la plus forte de MVH a été détectée dans le cytoplasme d'ovocytes primordiaux et elle diminue au cours de la maturation des ovocytes. Dans le testicule, MVH est spécifiquement exprimée dans les CG dès le stade des spermatogonies jusqu'aux spermatides rondes, avec une forte expression au stade spermatocyte précoce. De plus, cette protéine semble être exclusivement localisée dans le cytoplasme de ces cellules spermatogéniques, et une coloration granulaire a été observée dans les spermatocytes au stade pachytène et dans les spermatides rondes (Fujiwara *et al.*, 1994; Toyooka *et al.*, 2000). De plus, les souris mâles invalidées pour *Mvh* montrent une déplétion complète des CG post-méiotiques, et des testicules atrophiés à environ un cinquième de la taille normale des testicules adultes des souris sauvages. Les souris femelles *Mvh*^{-/-} sont fertiles et elles ne présentent aucun défaut ni dans leur histologie, ni dans la reproduction. Cela suggère que chez la souris, *Mvh* est nécessaire pour la spermatogenèse alors qu'il n'intervient pas dans l'ovogenèse (Tanaka *et al.*, 2000). Par ailleurs, chez l'homme, VASA est exprimée dans les CGP plus tôt que chez la souris puisque la première expression est détectée pendant leur migration. En effet, VASA est présent dans les CG des gonades fœtales et adultes chez les mâles et femelles et elle est plus abondante dans les spermatocytes et les ovocytes matures (Castrillon *et al.*, 2000). *Mvh* est donc un marqueur très spécifique des CG et utile pour les études de leur détermination ainsi que leur fonction (Noce *et al.*, 2001). Enfin, chez les marsupiaux et les monotermes, VASA est absente dans les CG fœtales mais s'exprime dès le 1^{er} jpp chez les deux sexes. La localisation de VASA au cours de l'ovogenèse et la spermatogenèse est similaire chez le wallaby et l'ornithorhynque. En effet, dans l'ovaire, les CG expriment VASA à tous les stades de l'ovogenèse post-natale. Alors que chez les mâles, VASA est présente au cours de la spermatogenèse dans les spermatocytes et les spermatides rondes (Hickford *et al.*, 2011).

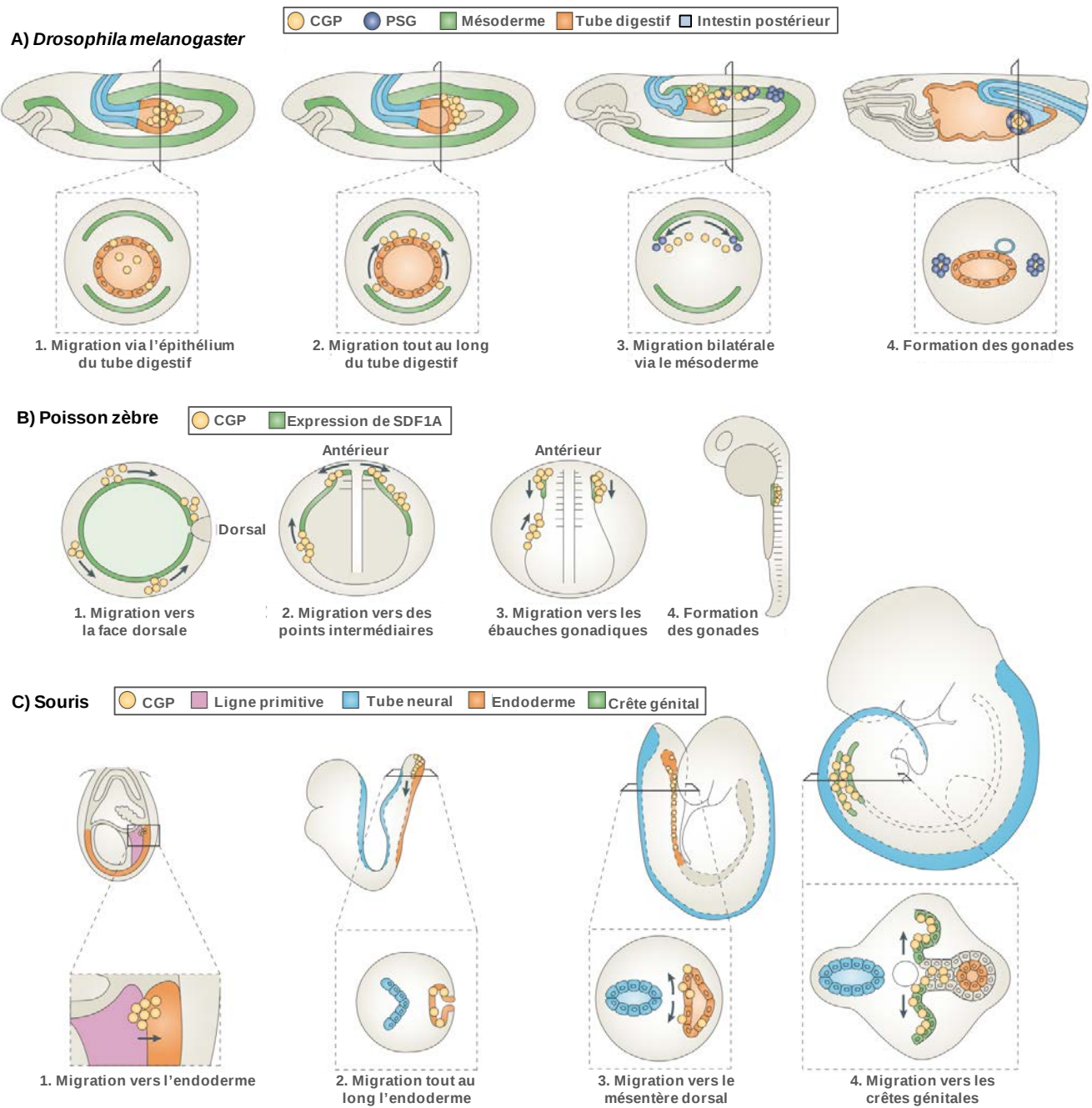


Figure 47 : Migration des CGP chez différents organismes modèles. Chez la drosophile, le poisson-zèbre et la souris, *Vasa* est exprimé dans toutes les CGPs en migration (d'après Richardson & Lehmann, 2010).

IV.2.6) VASA et la migration des CGP

L'utilisation de *vasa* comme marqueur des CGP a permis d'élucider ou de confirmer les voies de migration de ces cellules, ainsi que leur mode de prolifération chez beaucoup d'espèces. Le mode général de migration des CGP est le suivant : les CGP migrent d'abord passivement suivant les mouvements morphogénétiques des différentes couches cellulaires au cours de la gastrulation, depuis leur zone de formation vers l'intérieur de l'embryon près du tube digestif en formation. Les CGP migrent ensuite activement le long ou au travers des couches cellulaires puis se séparent en deux groupes pour rejoindre les ébauches gonadiques mésodermiques situées bilatéralement par rapport à l'axe du corps de l'animal (Saffman & Lasko, 1999; McLaren, 2003; Richardson & Lehmann, 2010) (Figure 47). Chez le poisson zèbre, l'analyse des ARNm *vasa in situ* (Olsen *et al.*, 1997; Weidinger *et al.*, 1999) et de la protéine VASA par immunohistochimie (Baat *et al.*, 2000) ont montré que les CGP, formées en quatre point différents, migrent dans différentes directions pendant la gastrulation pour arriver finalement au même endroit, le long du mésoderme du tronc de l'embryon. Puis elles se séparent en deux groupes répartis bilatéralement par rapport à l'axe du corps et migrent vers les ébauches gonadiques en formation (Weidinger *et al.*, 2002; Raz, 2003) (Figure 47). Une prolifération des CGP est observée avant ou pendant la migration. En parallèle, une partie des CGP est perdue au cours de la migration (Wylie, 1999). Ainsi, les quatre CGP formées initialement se divisent pour donner environ 30 CGP chez le poisson zèbre. Des 40 CGP présentes dans l'embryon de drosophile avant migration, il n'en reste qu'une vingtaine après migration alors que chez la souris, elles passent d'une centaine avant migration à environ 25000 après leur positionnement dans les crêtes génitales (Saffman & Lasko, 1999; Raz, 2003).

IV.3) Développement gonadique en absence de cellules germinales

Il est clair que les cellules somatiques ont une importance dans la différenciation des gonades, d'une part en exprimant les signalisations moléculaires du développement sexuel mâle (*Sry*, *Sox9*, *Fgf9* et *Amh*) et femelle (*Rspo1* et *Wnt4*) (Kocer *et al.*, 2009; Parma & Radi, 2012), et d'autre part en régulant l'entrée en méiose des CG (Bowles & Koopman, 2007; Bowles *et al.*, 2010). En effet, le gène de la détermination du sexe mâle *Sox9* comme ceux de la détermination du sexe femelle, *Rspo1* et *Wnt4* s'expriment faiblement dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle. Dans la gonade XY, l'expression de *Sox9* et *Fgf9* deviennent plus forte suite à celle de *Sry*, et en plus, *Fgf9* réprime l'expression de *Wnt4* et induit ainsi la différenciation mâle. Alors que, dans la gonade XX, il n'y a pas d'expression

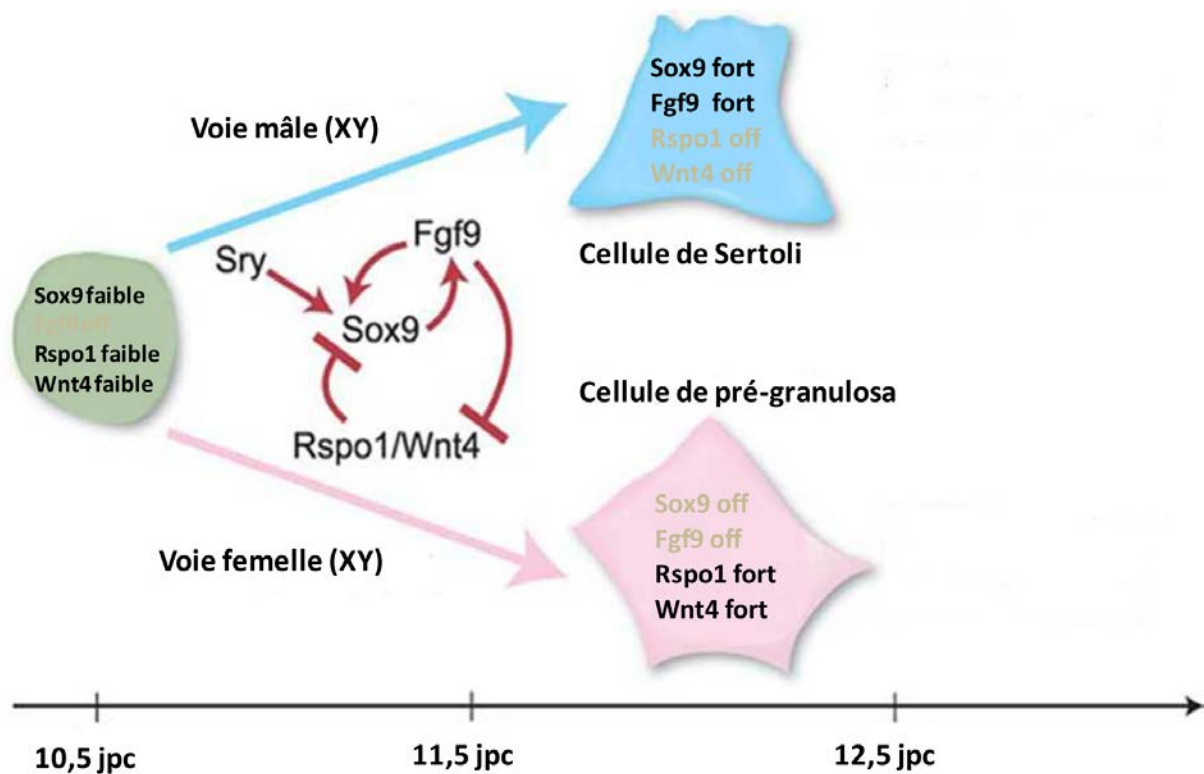


Figure 48 : Les cellules somatiques expriment les signalisations moléculaires du développement sexuel. Schéma représentatif de la différenciation d'une cellule somatique « de soutien » (en vert) en cellule de Sertoli (en bleu) chez le mâle et en cellules de la pré-granulosa (en rose) chez la femelle chez la souris. Le gène de la détermination du sexe mâle *Sox9* s'exprime faiblement dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle, tandis que *Fgf9* n'est pas exprimé. L'expression des gènes de la détermination du sexe femelle, *Rspo1* et *Wnt4*, est également faible dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle. Dans la gonade XY, l'expression de *Sox9* et *Fgf9* seraient induites suite à celle de *Sry*. *Fgf9* réprime l'expression de *Wnt4* et induit ainsi la différenciation mâle. Dans la gonade XX, il n'y a pas de *Sry* donc peu d'expression de *Fgf9* et de *Sox9*. *Rspo1* réprime l'expression de *Sox9* et induit celle de *Wnt4* activant ainsi la différenciation femelle (d'après Kocer *et al.*, 2009).

de *Sry* donc peu d'expression de *Fgf9* et de *Sox9*. *Rspo1* réprime l'expression de *Sox9* et induit celle de *Wnt4* ; activant ainsi la différenciation femelle (Figure 48) (Kocer *et al.*, 2009). Par ailleurs, la détermination sexuelle des CG se fait par deux molécules de signalisation produites par des cellules somatiques : l'acide rétinoïque (AcR) (dérivé biologiquement actif de la vitamine A) et FGF9. Ainsi, *Cyp26b1* et *Fgf9* sont fortement exprimés dans le testicule, tandis qu'ils sont réprimés dans l'ovaire. En effet, CYP26B1 (membre de la famille des cytochromes P450) induit la dégradation de l'AcR dans le testicule, tandis que dans l'ovaire, *Cyp26b1* n'est pas exprimé et donc l'AcR est présent en plus grande quantité. L'AcR et FGF9 agissent directement sur les CG en induisant ou réprimant respectivement l'expression de *Stra8* (*Stimulated by Retinoic Acid gene 8*). Ce dernier est important pour induire l'entrée en méiose des CG mais le mécanisme est inconnu (Figure 49) (Bowles *et al.*, 2010). En conclusion, les interactions cellulaires « soma-germen » sont importantes dans la différenciation gonadique. Cependant, les CG pourraient aussi jouer un rôle dans cette différenciation. En effet, la mutation *hotei* dans le récepteur de type II de l'AMH, AMHR-II, chez le medaka entraîne une prolifération anormale des CG suivie dans certains cas d'une inversion sexuelle féminisante. Donc, il est intéressant de pouvoir éliminer les CG avant la différenciation gonadique pour évaluer leur rôle. Pour cela, différentes méthodes ont été utilisées afin d'éliminer les CG chez plusieurs vertébrés.

IV.3.1) Méthodes utilisées afin d'éliminer les cellules germinales

IV.3.1.1) Irradiation

IV.3.1.1.1) Généralités

L'irradiation est l'exposition à des rayonnements. Lorsqu'un rayonnement pénètre dans la matière, il peut interagir avec les atomes rencontrés et perdre à chacune de ces interactions une partie de son énergie. Cette énergie cédée sur place est transférée au milieu traversé. Cela définit la dose absorbée en Gray (Gy), qui correspond à un Joule d'énergie absorbée par kilogramme de matière. C'est une dose d'exposition qui provoque un effet biologique. Dans le cas des rayonnements α , β , γ ou X, ceux-ci contribuent à une ionisation des molécules présentes dans les organismes et de ce fait induisent des modifications structurales de la matière. On parle alors dans leur cas de rayonnement ionisant (RI). Ils induisent un stress génotoxique qui provoque des dommages à l'ADN. On distingue différents types

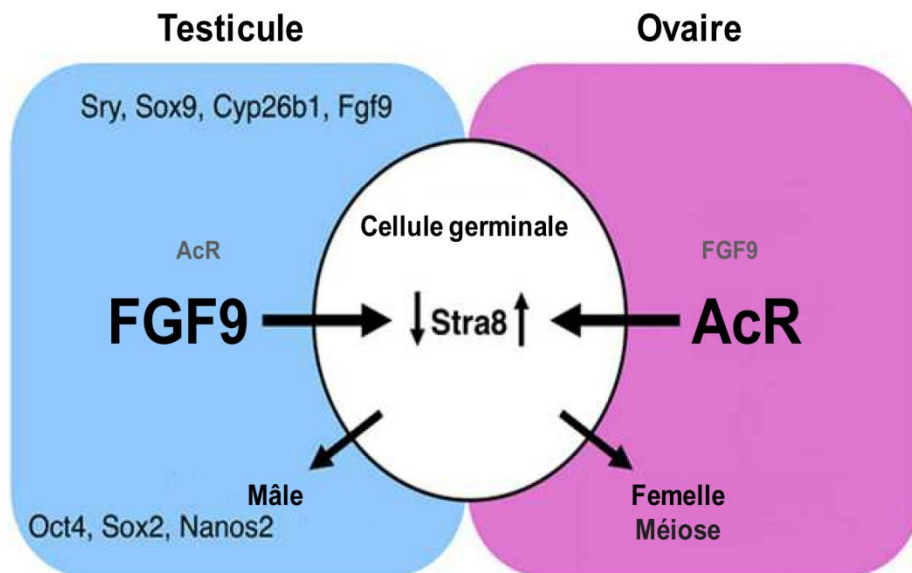


Figure 49 : Les cellules somatiques régulent la détermination sexuelle des cellules germinales (CG). L'acide rétinoïque (AcR) et FGF9 agissent de façon antagoniste en déterminant le destin des CG. La détermination sexuelle des CG se fait par deux molécules de signalisation produites par des cellules somatiques : AcR et FGF9. *Cyp26b1* et *Fgf9* sont fortement exprimés dans le testicule (bleu), tandis qu'ils sont réprimés dans l'ovaire (rose). En effet, CYP26B1 induit la dégradation de l'AcR dans le testicule, tandis que dans l'ovaire, *Cyp26b1* n'est pas exprimé. L'AcR est donc présent en plus grande quantité dans l'ovaire. AcR et FGF9 agissent directement sur les cellules germinales en induisant ou réprimant respectivement l'expression de *Stra8*. Ce dernier est important pour induire l'entrée en méiose des CG mais le mécanisme est inconnu. FGF9 agit de façon antagoniste sur l'expression de *Stra8* ; il maintient également l'expression de gènes marqueurs de pluripotence comme *Oct4* et *Sox2*, et induit l'expression de gènes marqueurs de CG mâles comme *Nanos2* (d'après Bowles *et al.*, 2010).

d'altérations : une dégradation ou disparition de bases de l'ADN, des cassures de l'un ou des deux brins ainsi que des pontages entre l'ADN et les protéines. Ces dommages sont spécifiques de la nature du rayonnement. En ce qui concerne l'irradiation γ ; ce sont essentiellement des cassures simple et surtout double-brin de l'ADN qui sont induites (Pawlik & Keyomarsi, 2004). L'irradiation est utilisée notamment à des fins médicales, militaires, scientifiques et industrielles, et c'est la commission des nations Unies, l'UNSCEAR, qui mesure les taux globaux et les effets des RI auxquels nous pouvons être exposé. Elle a défini les faibles doses comme des doses inférieures à 0,2 Gy pour l'irradiation γ .

IV.3.1.1.2) Les effets biologiques des RI sur les cellules

La conséquence pour la cellule de l'exposition à l'irradiation va dépendre de nombreux paramètres notamment de sa capacité proliférative, de la période du cycle au cours de laquelle a eu lieu l'irradiation, de sa capacité à réparer son ADN, de la machinerie apoptotique présente et de la dose reçue (Gudkov & Komarova, 2003; Pawlik & Keyomarsi, 2004). La cellule a alors plusieurs devenir possibles. Elle va soit activer le processus apoptotique et disparaître si les dommages sont trop importants (Figure 50). Sinon la cellule arrête de proliférer pour essayer de réparer son ADN lésé. Si cette réparation est fidèle la cellule reprendra son cycle correctement. Si ce n'est pas le cas, la cellule ayant accumulé des erreurs dans son génome se dirigera vers l'apoptose, l'arrêt définitif de sa prolifération ou alors vers une transformation en cellule cancéreuse (Figure 50). En général, l'apoptose immédiate est caractéristique des cellules hautement proliférantes telles que les CG mâles chez l'adulte, alors que les cellules en majorité quiescentes que sont les cellules hautement différenciées comme les cellules musculaires ont recours à l'arrêt définitif de leur cycle ce qui est souvent considéré comme une forme de radiorésistance car leur nombre de ce fait varie peu. Néanmoins certains tissus constitués de cellules en majorité quiescentes sont très radiosensibles comme la rate ou le thymus (Gudkov & Komarova, 2003).

IV.3.1.2) Invalidation de gènes de cellules germinales

La perte de fonction peut être induite par l'utilisation de morpholinos (MOs), des oligonucléotides anti-sens, artificiellement synthétisés, qui utilisent le cycle morpholine C_4H_9NO pour remplacer le squelette ribose des acides nucléiques (Summerton & Weller, 1997) (Figure 51). Ce remplacement permet aux MOs d'être résistants à la digestion par la nucléase, en plus d'améliorer ses activités de liaison à leurs séquences complémentaires d'ARN dans les cellules (Summerton, 1999). De cette manière, les MOs se fixent sur l'ARN

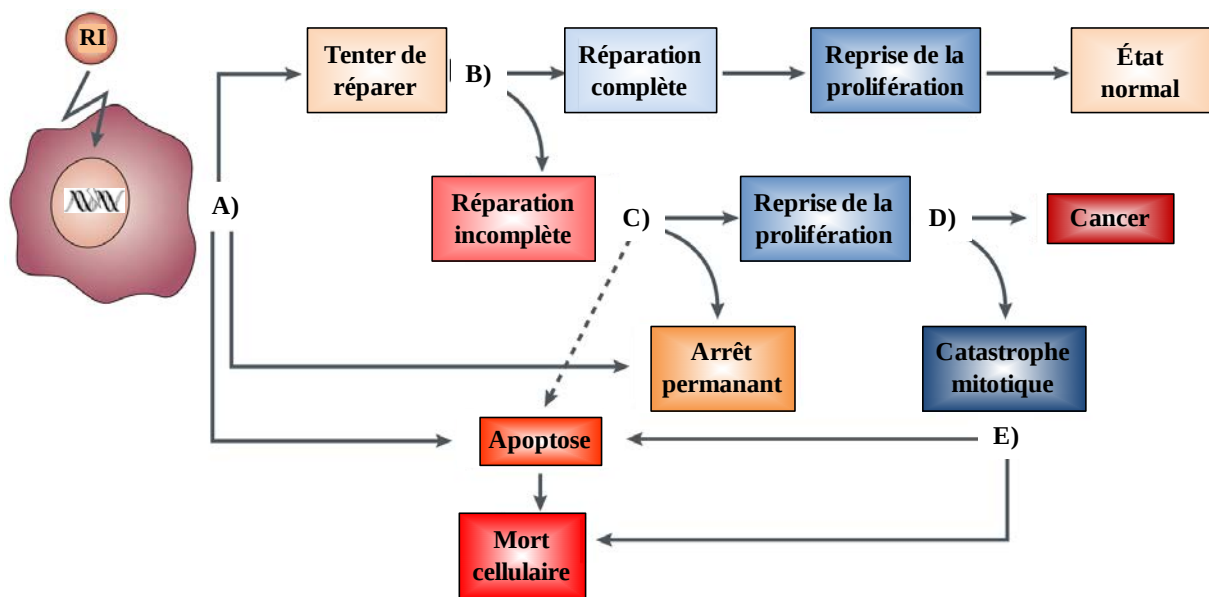


Figure 50 : Les points critiques d'une cellule exposée aux rayonnements ionisants RI. **A)** Suite à une exposition aux RI, la cellule peut subir l'apoptose ou un arrêt permanent du cycle cellulaire. La mort cellulaire détermine les conséquences pathologiques aiguës des RI. **B)** Les cellules qui tentent de réparer les dommages pourraient rétablir complètement l'ADN endommagé et continuer à fonctionner normalement. **C)** Toutefois, si le dommage est irréparable, la cellule peut rester définitivement en arrêt ou faire une tentative pour reprendre la prolifération. On ignore si l'apoptose peut se produire sans reprendre la prolifération (ligne pointillée). **D)** En cas d'un dommage irréparable non mortel, la cellule va continuer à proliférer éventuellement avec des mutations acquises ; augmentant ainsi le risque de développement du cancer. **E)** Si les dommages sont importants, la cellule subit une catastrophe mitotique suivie de la mort apoptotique ou nécrotique (d'après Gudkov & Komarova, 2003).

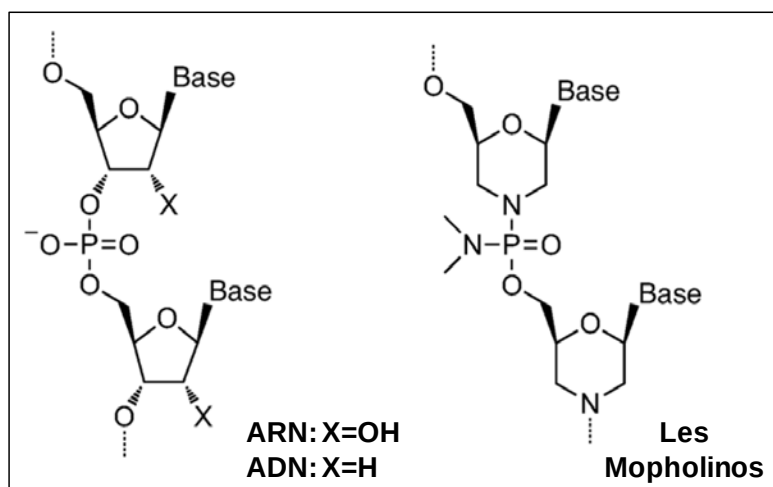


Figure 51 : Comparaison entre la structure chimique de l'ADN ou de l'ARN et celle de Morpholinos (MOs) (d'après Yamazoe *et al.*, 2012).

du gène d'intérêt et peuvent ainsi exercer leurs effets post-transcriptionnels soit en bloquant la traduction des protéines, soit en perturbant l'épissage (Huang *et al.*, 2012).

Cette stratégie est très utilisée chez les poissons au cours du développement précoce, où le MO est micro-injecté dans l'œuf fécondé, au stade une cellule, afin d'inhiber les gènes impliqués dans la survie des CG ou leur migration. Mais le développement lent chez la truite, par exemple, ne permet pas de micro-injecter un MO à ce stade pour étudier les processus de différenciation gonadique, car ceux-ci se déroulent plus d'un mois après la fécondation, ce qui est trop long pour observer les effets du MO. Dans ce cas l'injection des MOs peut être réalisée directement dans la cavité péritonéale de l'embryon durant la période de différenciation gonadique (Nicol, 2011). Cependant, d'autres méthodes ont également été mises au point chez le poisson zèbre et utilisées dans différentes buts : injection des MOs dans le jaune au stade mi-blastula pour inhiber les gènes impliqués dans le développement asymétrique, électroporation des MOs au niveau des nageoires ou de la rétine des poissons adultes afin d'étudier les mécanismes de la régénération (Amack & Yost, 2004; Thummel *et al.*, 2006, 2011). Par ailleurs, les applications des MO ont été également étendues à des modifications supplémentaires. En effet, les MO marqués par la fluorescéine, une molécule fluorescente, permettent d'étudier les populations cellulaires dont l'expression du gène cible a été inhibée (Hyde *et al.*, 2012). En plus, des versions récentes de MO : « caged-MO ou photo-MO » permettent un silencing conditionnel des gènes dans un tissu défini et d'une manière temporelle, en utilisant un éclairage ciblé *via* un rayonnement ultraviolet (UV, 360 nm), ou *via* l'irradiation par deux photons (Shestopalov *et al.*, 2012; Tallafuss *et al.*, 2012).

IV.3.1.3) Traitement par les agents alkylants

Les agents alkylants sont généralement des composés fortement électrophiles qui peuvent réagir avec des molécules possédant des radicaux nucléophiles tels que les groupements -SH, -OH, -COOH ou -NH₂ que l'on retrouve dans les acides nucléiques et les protéines. Cela se produit selon une réaction de substitution nucléophile, ayant pour conséquence le greffage d'un groupe alkyle sur la base cible. On distingue des agents alkylants mono-fonctionnels, c'est à dire n'ayant qu'un seul lien chimique avec l'ADN, et les agents bi-fonctionnels qui peuvent s'accrocher sur deux sites distincts de l'ADN (agents réticulants). La plupart des alkylants utilisés en thérapeutique sont bi-fonctionnels. Ils possèdent deux groupes alkyles susceptibles de relier deux nucléotides adjacents. Ils forment donc des ponts intra-/inter-brins (Figure 52A) rendant ainsi la réplication ou la transcription de l'ADN impossible (Noll *et al.*,

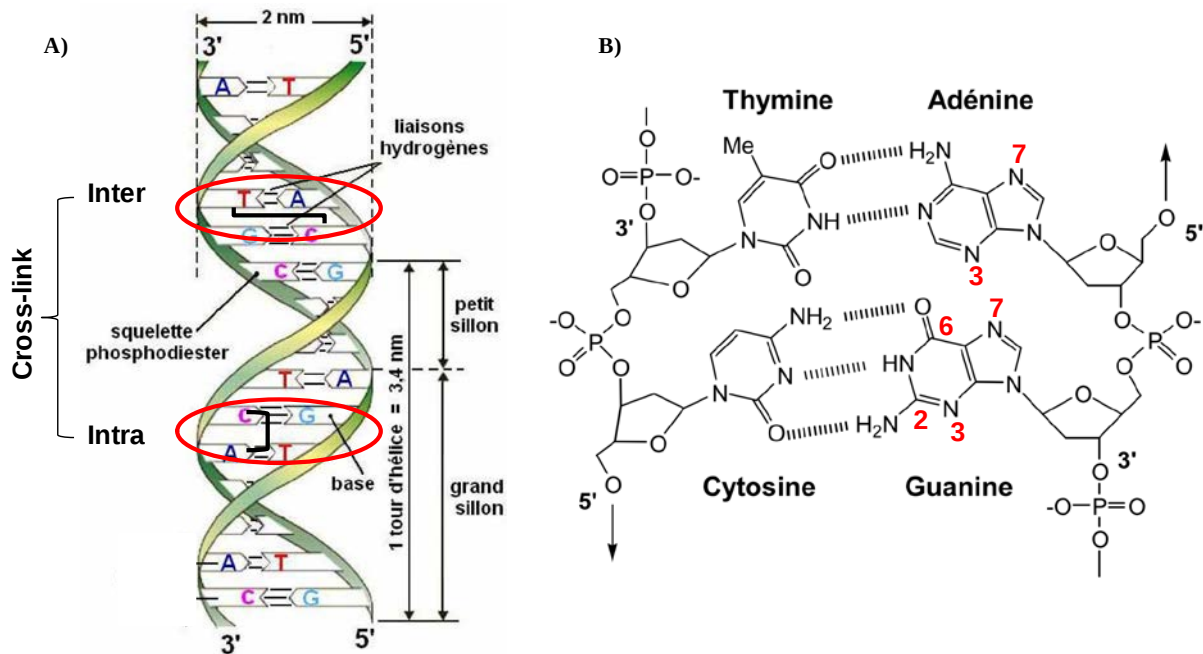


Figure 52 : Effets d'agents alkylants sur l'ADN. A) Liaisons intra- et inter brins dans l'ADN. Selon le modèle de Watson et Crick, la molécule d'ADN est formée de deux brins complémentaires enroulés en hélice de façon antiparallèle, donnant naissance à un grand et à un petit sillon. Ces deux brins sont constitués d'un enchaînement précis (séquence) d'unités élémentaires que sont les nucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). Un nucléotide est composé d'un phosphate relié à un sucre, le 2'-désoxyribose, lui-même relié à une base azotée. L'adénine (A) et la guanine (G) sont des bases puriques, la cytosine (C) et la thymine (T) des bases pyrimidiques. Les liaisons hydrogènes qui lient les bases des deux brins complémentaires vont stabiliser la double hélice. Les agents alkylants induisent la formation de ponts inter ou intra brins qui empêchent la réplication ou la transcription. **B)** Sites d'alkylation des bases. Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des guanines qui présentent quatre sites potentiels de fixation (N2, N3, N7 et O6), alors que les adénines n'en présentent que deux (N3 et N7). L'azote (N7) de la guanine est la cible principale de l'alkylation.

2006). De plus, ces lésions induisent souvent des cassures simple- ou double-brins de l'ADN ce qui conduit à l'apoptose de la cellule ou à la mise en exécution des systèmes de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales (phénomène de résistance).

Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des bases puriques, plus particulièrement au niveau des guanines qui présentent quatre sites potentiels de fixation (N2, N3, N7 et O6), alors que les adénines n'en présentent que deux (N3 et N7) (Figure 52B). L'azote (N7) de la guanine est la cible principale de l'alkylation puisqu'il a le plus haut potentiel électrophile de l'ADN, puis les suivants ont des potentiels de moins en moins élevés : O6-guanine et N3-adénine > N2-guanine, N3 guanine et N7-adénine. Ces agents pharmacologiques comprennent un très grand nombre de substances utilisées en thérapeutique, parmi lesquelles : les moutardes à l'azote comme la chlorométhine (Caryolysine®), les nitroso-urées comme la carmustine (Bicnu®), les alkylsulfonates tels que le busulfan (Misulban®), les éthylènes-imines comme l'altréamine (Hexastat®). L'intérêt antitumoral de cette classe de composés réside dans le fait qu'ils sont capables d'établir rapidement des liaisons covalentes avec l'ADN. Malgré leur préférence pour les cellules en division, ils affectent aussi bien les cellules normales que tumorales. Ce manque de spécificité anti-tumorale entraîne de nombreux dommages aux cellules des tissus sains. Ceux-ci se manifestent par les effets secondaires de la chimiothérapie (perte de cheveux, stérilité...).

IV.3.1.3.1) Le Busulfan : structure, mode d'action et rôle

Le busulfan (Bu) (1,4-butanediol dimethanesulfonate) ($C_6H_{14}O_6S_2$) (Figure 53) appartient à la famille des agents bis-alkylants. Sa masse moléculaire est de 246,31 g/mol. Bu est très peu soluble dans l'eau mais présente un caractère lipophile. Il est un agent alkylant bi-fonctionnel capable d'interagir avec l'ADN et les protéines nucléaires. En effet, l'alkylation de l'ADN par Bu représenté par la formation de liaisons intra-/inter-brins ADN-ADN se produit via l'interaction du Bu avec l'azote en position 7 (N7) des guanines de l'ADN (Galaup & Paci, 2013). La capacité de former des liaisons inter-brins d'ADN est corrélée avec la cytotoxicité *in vitro* (Ponti *et al.*, 1991). Par ailleurs, Bu, comme tous les dimethanesulphonates, a été également signalé comme induisant des liaisons ADN-protéine médiées par la réaction entre l'ADN et la cystéine 114 de l'histone H3. Ces liaisons ADN-ADN et ADN-protéine altèrent considérablement la réplication cellulaire, la réparation de l'ADN ainsi que la transcription (Galaup & Paci, 2013).

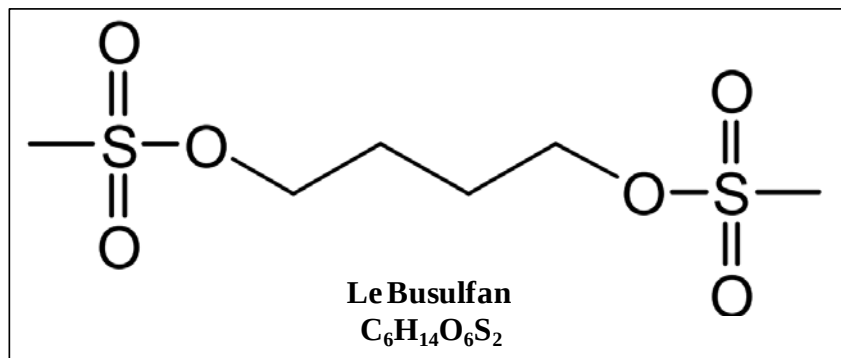


Figure 53 : Formule chimique du busulfan.

Bu a un effet cytotoxique sur les cellules souches hématopoïétiques. Contrairement à d'autres agents alkylants, Bu semble avoir un effet plus fort sur les tissus à prolifération lente par rapport à ceux à prolifération rapide (Marsh, 1976). Il est utilisé en chimiothérapie ainsi qu'en oncologie pour traiter la leucémie et d'autres types de troubles sanguins. À faible dose, il est plus spécifique des cellules myéloïdes de la lignée granulocytaire, alors qu'à fortes doses, l'ensemble des lignées hématopoïétiques est atteint (Galaup & Paci, 2013). Enfin, le traitement au Bu semble être une méthode efficace pour éliminer les CG, largement utilisée chez plusieurs espèces de vertébrés afin d'étudier l'importance de ces cellules au cours du développement gonadique.

IV.3.2) Effet de l'absence des CG sur la différenciation gonadique chez les vertébrés

IV.3.2.1) Chez les mammifères

Chez les mammifères, l'effet de la perte des CG a été étudié autant chez le mâle que la femelle. Dans les gonades XY, la déplétion des CG ne perturbe pas le développement des testicules et n'affecte pas la différenciation des cellules somatiques, bien que l'organisation des cordons testiculaires soit retardée (McLaren, 1991). En effet, il a été montré que l'exposition des rats mâles au Bu (10 mg/kg) entre le 5^{ème} jpc et le 7^{ème} jpc n'a aucun effet sur les CG fœtales, alors que l'exposition au Bu entre 11-14 jpc induit une augmentation du nombre de tubules «stériles» atteignant près de 100%. Si l'exposition au Bu a lieu au 16^{ème} jpc, le pourcentage des tubules stériles devient presque nul, et les testicules semblent normaux après le traitement au 18^{ème} ou 20^{ème} jour de gestation. Si l'administration du Bu a lieu le 1^{er} jpp (durant la période néonatale), les spermatogonies de type A n'ont pas été détectées dans le testicule de 15 jpp après alors que certaines de ces cellules sont présentes après le traitement au 4-7^{ème} jpp. En revanche, le nombre de cellules de soutien n'a pas été affecté par le traitement ni pendant la gestation ni dans la période néonatale. Les auteurs ont conclu que la sensibilité des CG au Bu augmente rapidement pendant la gestation et diminue ensuite au cours de la période néonatale. Ce changement est associé à une diminution du nombre de gonocytes et une augmentation du niveau de mitoses germinales représenté par la production des spermatogonies de type A. La faible sensibilité au 4^{ème} jpp peut être attribuée soit à un changement dans la sensibilité des gonocytes et/ou à la présence de spermatogonies de type A qui apparaissent à cette période. En plus, il semble probable qu'à la suite du traitement au Bu, la diminution du nombre des tubules «stériles» associée avec l'âge représente la capacité de

régénération du testicule. Ainsi, suite à un traitement réalisé à 9 jpc, bien que 57% de tubules « stériles » sont détectés au 1^{er} jpp, 9% seulement ont été trouvés dans le testicule adulte. De même, après un traitement au 11^{ème} jpc, 89% des tubules ont été identifiés comme « stériles » à la naissance, mais seulement 15% dans le testicule adulte (Hemsworth & Jackson, 1962, 1963a).

De même, chez les souris adultes mâles, l'injection de Bu à 30 mg/kg induit une absence progressive des CG ; les spermatogonies sont perdues entre 5 et 10 jours post-traitement (jpt), tandis que les spermatocytes et les spermatides ont disparu à 10 et 20 jpt respectivement. La plupart des tubules séminifères sont dépourvus de CG après 30 jpt, mais une régénération précoce de CG apparaît dans certains tubules après 50 jpt (O'Shaughnessy *et al.*, 2003, 2008). L'expression de plusieurs gènes spécifiques des cellules de Sertoli tels que *Dhh*, *Wt1*, *Gata1* et *Sox9* ne varie pas après le traitement au Bu, suggérant que les CG n'affectent pas la différenciation du compartiment somatique dans les testicules. L'expression d'autres gènes comme *Wnt5a* et *Amh* est significativement augmentée après 30 jpt, période où est observée la disparition des spermatides et spermatozoïdes; ce qui suggère que les CG peuvent réguler l'activité des cellules de Sertoli, notamment les CG post-méiotiques (O'Shaughnessy *et al.*, 2008).

Dans les gonades XX, il a été montré que l'effet du Bu à 10 mg/kg sur l'ovaire fœtal et néonatal du rat dépend de l'âge au moment du traitement. Ainsi, l'effet maximum du Bu entraînant la stérilité de tous les descendants femelles, est observé suite à un traitement fait entre les 13^{ème}-16^{ème} jpc. La majorité des descendants traités au 11^{ème} jpc et tous ceux qui sont traités au 18^{ème} jpc et après la naissance sont entièrement fertiles (Hemsworth & Jackson, 1963b). Pour ce qui concerne l'ovaire en développement il semble que l'action de Bu est confinée aux précurseurs des ovocytes, les ovogonies, et que lorsque ces cellules entrent en méiose à environ 17 jpc, une diminution importante de leur sensibilité se produit (Hemsworth & Jackson, 1962, 1963b).

Par ailleurs, l'irradiation γ de rattes gestantes à 15 jpc, indique que les CG sont essentielles à la différenciation ovarienne (Guigon & Magre, 2006). En effet, en l'absence de CG dans les crêtes génitales, les cellules somatiques des gonades indifférenciées continuent à proliférer et les deux compartiments de l'ovaire semblent se différencier normalement : le tissu interstitiel et les cordons ovigères (CO), structures épithéliales en continuité avec la surface épithéliale des ovaires (cortex) contenant les ovogonies et les cellules somatiques (pré-granulosa). Néanmoins, les CO appauvris en CG ne se décomposent pas en unités folliculaires et peuvent persister de quelques semaines à quelques mois après la naissance avant de régresser (Mazaud

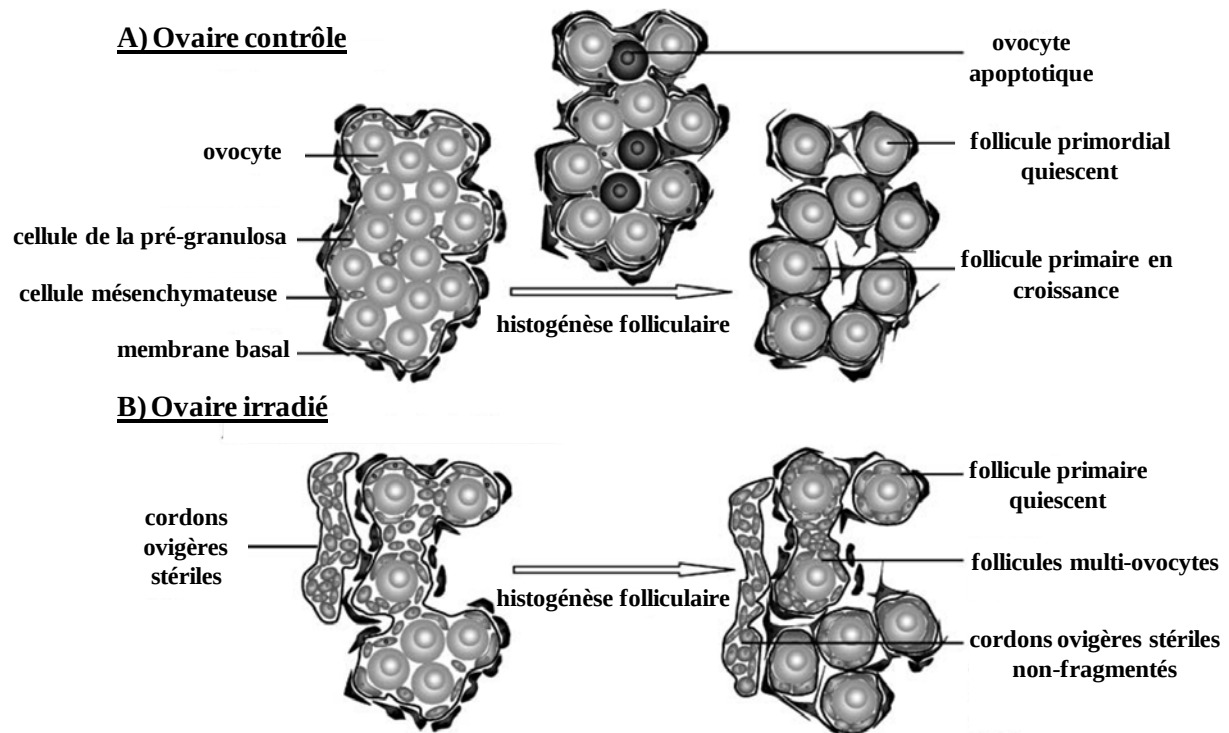


Figure 54 : Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires de l'histogénèse folliculaire.

A) Ovaire contrôle B) Ovaire irradié. Lorsque les cordons ovigères sont totalement stérilisés, ils conservent les caractéristiques fœtales. Lorsque très peu d'ovocytes sont présents au sein d'un cordon ovigère, le processus de fragmentation ne se produit pas, et de ce fait plusieurs ovocytes restent dans une structure épithéliale unique, formant ainsi un follicule multi-ovocytes. Lorsque la densité des ovocytes est suffisante pour que l'histogénèse folliculaire se produise, le nombre relativement élevé de cellules épithéliales induit la différenciation des follicules, qui doivent être classés comme des follicules primaires ou secondaires (d'après Mazaud Guittot *et al.*, 2006).

et al., 2002; Guigon & Magre, 2006). Ces femelles irradiées pendant la période fœtale présentent une puberté et une fertilité normale au début de leur vie reproductive mais présentent une insuffisance ovarienne prématurée. Par ailleurs, les analyses détaillées des populations folliculaires ont révélé que la structure et la dynamique folliculaire sont modifiées pendant la période immature, que le stock de follicules primordiaux est absent et que les follicules primaires restent quiescents plus longtemps que dans les ovaires témoins au cours de la période néonatale (Mazaud *et al.*, 2002). Plus récemment, il a été montré que juste après la naissance des femelles irradiées, en plus des CO stériles, quelques follicules sont apparus avec des caractéristiques anormales par rapport à ceux des ovaires normaux. Ainsi, les ovaires irradiés présentent une fréquence plus élevée de follicules contenant deux ou trois ovocytes, aussi appelés des follicules multi-ovocytes (FMO). Les analyses au moment de l'histogénèse folliculaire ont révélé que ces FMO résultent d'une rupture incomplète des CO. L'ensemble des résultats indiquent que chez les femelles, l'irradiation et l'altération massive des CG pendant la vie fœtale induit des perturbations dans l'histogénèse folliculaire ; en soulignant la différenciation des FMO et des follicules primaires quiescents qui finalement se transforment en follicules en croissance et participent à la fonction ovarienne (Figure 54) (Mazaud Guittot *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que chez les rattes faisant l'objet d'une irradiation γ à 5 jpn, la perte de CG se produit au stade de la méiose et elle peut induire une inversion sexuelle caractérisée par la présence de cordons séminifères dans l'ovaire (McLaren, 1991; Guigon *et al.*, 2005). Ils se composent de cellules présentant les caractéristiques morphologiques des cellules de Sertoli : un cytoplasme allongé, un emplacement basal du noyau, des jonctions spécifiques de cellules de Sertoli et une spécialisation ectoplasmique. De plus, ces cellules « Sertoli-like » expriment FOXL2, marqueur femelle-spécifique, mais pas SOX9, marqueur mâle-spécifique. Ceci suggère que les caractéristiques moléculaires des cellules de la granulosa sont maintenues malgré la trans-différenciation cellulaire masculine. En outre, il a été montré que l'expression de l'AMH a commencé dans les cellules folliculaires des gros follicules appauvris en ovocytes, et qu'elle est maintenue par la suite à travers le processus de trans-différenciation en cellules « Sertoli-like » (Guigon *et al.*, 2005; Guigon & Magre, 2006). Par ailleurs, la trans-différenciation en cellules « Sertoli-like » commence dans la période pré-pubertaire et continue tout au long de la vie adulte. Cet intervalle très variable entre la perte d'ovocytes et la conversion cellulaire suggère que cette trans-différenciation n'est pas déclenchée seulement par la perte de CG, mais aussi par un processus multi-étapes,

nécessitant le recrutement et la maturation des cellules folliculaires dans les follicules appauvris en ovocytes et impliquant une régulation endocrinienne par les taux plasmatiques élevés de FSH (Guigon *et al.*, 2005).

IV.3.2.2) Chez les sauropsidés

Chez les oiseaux, après la distribution d'environ 30 à 130 CGP dans la zone centrale de la zone pellucide au stade 10 chez le poulet, elles se déplacent par des mouvements passifs pendant la formation de la ligne primitive vers une région extra-embryonnaire appelée croissant germinal. Les CGP se localisent à l'intérieur des vaisseaux sanguins se formant dans le croissant germinal au stade 10 ou 11, et commencent à circuler par voie sanguine. La concentration de CGP atteint un pic dans la circulation sanguine au stade 14 (50-53 h d'incubation). Ensuite, les CGP commencent à se concentrer dans le mésoderme intermédiaire au stade 15 (50-55 heures d'incubation) et augmentent au stade 17 (52-64 h d'incubation) et quittent les vaisseaux sanguins pour migrer le long du mésentère dorsal et former les crêtes génitales.

Par rapport à l'effet de l'absence de CG sur le développement gonadique chez les oiseaux, il a été montré que lorsque les CGP sont éliminées des jeunes embryons aux stades (6-11, soit 23-45 heures d'incubation) par excision du croissant germinal antérieur, les éléments somatiques des gonades continuent à subir une différenciation sexuelle normale. En effet, à tous les stades étudiés, y compris la gonade indifférenciée (à 6 jours d'incubation), le testicule et l'ovaire différenciés (à 15 ou 20 jours d'incubation) respectivement, le développement du compartiment somatique des gonades stériles est exactement identique à celui observé dans les gonades normales aux mêmes stades (McCarrey & Abbott, 1978). Par ailleurs, la différenciation fonctionnelle des éléments somatiques des testicules et des ovaires n'est pas altérée par l'ablation des CG, car la production des androgènes et des œstrogènes est normale dans les gonades appauvries en CG (McCarrey & Abbott, 1982). En outre, chez le poulet, les mâles adultes stérilisés par l'irradiation γ ont montré une morphologie testiculaire normale avec les cellules de Sertoli dans des tubes séminifère ainsi que les cellules de Leydig (Trefil *et al.*, 2003, 2006). En plus, ces testicules sont capables de produire du sperme suite à une transplantation de cellules souches spermatogéniques, confirmant donc une fonction somatique normale dans le testicule en l'absence de CG (Trefil *et al.*, 2006). Par contre, des embryons femelles exposés à la 3H-thymidine présentent une stérilisation de l'ovaire gauche à l'âge adulte et montrent des signes de masculinisation (Callebaut, 1968). En plus des caractères sexuels secondaires « mâles-spécifiques », l'ovaire montre une structure anormale

avec des structures tubulaires analogues à des tubules séminifères (Callebaut, 1969). Ces résultats sont similaires aux observations faites chez les souris chez lesquelles les CG ne sont pas nécessaires dans les testicules, mais sont essentielles pour la fonction ovarienne.

L'irradiation (UV, γ et X) et l'application de Bu ont aussi été utilisées pour réduire le nombre de CGP chez les oiseaux mais cela était destiné à l'étude de modèles de chimères entre races différentes plutôt qu'à l'étude de la différenciation gonadique (Nakamura *et al.*, 2013). L'exposition d'embryons de poulet aux rayonnements ultraviolets conduit à une diminution du nombre de CGP qui ne représente plus que 30% du nombre observé chez les témoins non irradiés, mais cette méthode provoque également un certain nombre d'anomalies et de la mortalité (Aige-Gil & Simkiss, 1991). L'irradiation γ d'embryons de poulet entraîne aussi une diminution progressive dose-dépendante du nombre de CGP et du taux d'éclosions (Park *et al.*, 2010). Par ailleurs, les rayons X doux et durs ont des effets similaires sur le développement embryonnaire du poulet et de la caille (Atsumi *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2012b).

Le Bu est connu également pour sa toxicité sélective pour les CG chez les oiseaux (Aige-Gil & Simkiss, 1991; Hallett & Wentworth, 1991). Cependant, l'efficacité de cet agent est très variable à cause de la difficulté à fournir une quantité constante de Bu à l'embryon (Aige-Gil & Simkiss, 1991). En outre, le traitement au Bu n'est possible que dans le cas où le Bu n'interfère pas avec les CGP transférées (Hallett & Wentworth, 1991). Pour résoudre ce problème, Nakamura *et al.* ont développé une méthode efficace pour l'administration de Bu au cours du développement embryonnaire du poulet à l'aide d'une émulsion à libération prolongée. Grâce à sa densité inférieure à celle du vitellus, cette émulsion monte rapidement vers l'embryon localisé sur le dessus du vitellus quand elle est injectée dedans. De ce fait, l'injection de Bu solubilisé dans cette émulsion induit une altération cohérente et large des CGP endogènes (Nakamura *et al.*, 2008). Une étude ultérieure a montré que l'application précoce de Bu à des embryons receveurs permet de réduire l'effet stérilisant du Bu sur les CGP donneurs (Nakamura *et al.*, 2009). En plus, les CGP donneurs transférés à des embryons receveurs partiellement stérilisés après une administration de Bu ont été incorporées dans la lignée germinale du receveur et ont donné des gamètes fonctionnels (Nakamura *et al.*, 2010; Tagami & Nakamura, 2011).

De même, chez la tortue *Trachemys scripta*, l'administration de Bu induit une réduction importante du nombre de CG confirmée par le comptage de CG et par l'immuno-histologie en

utilisant VASA comme marqueur de ces cellules. En plus, en utilisant l'anti-laminine qui marque les cellules épithéliales et les cellules conjonctives, Di-Napoli et Capel ont montré que cette perte de CG induite par le Bu n'a pas modifié la morphologie cellulaire des testicules ou des ovaires fœtaux. La seule différence observée entre les testicules témoins et ceux des animaux traités au Bu est le nombre de cellules somatiques plus élevé chez les traités que chez les contrôles ce qui indique qu'en absence de CG, les cellules de Sertoli prolifèrent énormément. Cette différence n'est pas observée dans les ovaires. Les auteurs ont donc conclu que le développement morphologique des gonades fœtales est indépendant de la présence de CG chez la tortue *T. scripta*, suggérant que les mécanismes de ce processus sont conservés entre les vertébrés (DiNapoli & Capel, 2007). Comme la période de la maturité sexuelle est très longue chez *T. scripta* (3-4 ans), l'effet de la perte de CG sur les niveaux des hormones chez les adultes, les caractéristiques des gonades, ou les caractéristiques sexuelles secondaires n'ont pas été étudiés.

IV.3.2.3) Chez les poissons

Des résultats contradictoires ont été obtenus sur l'effet de la perte de CG chez les poissons. En effet, chez le medaka, il a été démontré que l'application de Bu à 25 µg/ml pendant les stades 17-37, correspondant à la migration des CGP, peut réduire le nombre de CG après l'éclosion et provoquer la formation de régions dépourvues de CG au cours du développement gonadique. Dans ces régions, les précurseurs des tubes séminifères en structure globulaire et les cavités ovariennes sont élaborés en absence des CG mais pas les follicules (Shinomiya *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent donc que la différenciation des cellules somatiques chez le medaka n'est pas dépendante des CG. En revanche, une inversion sexuelle femelle-mâle a été démontrée chez des medakas dépourvus de CG générés par l'injection d'oligonucléotides anti-sens MO dirigés contre le gène *cxcr4* (*chemoattractant receptor gene 4*), impliqué dans la migration des CGP lors de la gastrulation. Ce dernier processus est donc gravement affecté par l'inactivation de ce gène. Ces medakas déficients en CG montrent des caractères sexuels secondaires masculins au niveau de leurs nageoires dorsale et anale, accompagnés par une augmentation des androgènes (11-kétotestostérone) et une réduction des œstrogènes (17β-œstradiol). Par ailleurs, un seul type de gonade exprimant des gènes mâle-spécifiques (*Dmrt1*, *Sox9*) est formé chez ces mutants, quel que soit le sexe génétique. Les auteurs ont conclu que chez le medaka, les cellules somatiques peuvent former une gonade mâle en absence de la

fonction des CG, et que les CG jouent un rôle essentiel dans la génération du dimorphisme sexuel (Kurokawa *et al.*, 2007).

Chez le poisson zèbre, une perturbation ciblant des CG a été obtenue par deux méthodes différentes en donnant lieu à la génération d'adultes stériles (Slanchev *et al.*, 2005). La première méthode consistait à faire exprimer des toxines bactériennes dans les CGP en injectant l'embryon au stade une cellule avec l'ARNm codant pour la DT (*Diphtheria toxin*) catalytique fusionné à la 3'-UTR (*UnTranslated Region*) du gène *nos1* (celui-ci restreint l'expression de la protéine DT aux CGP) (Köprunner *et al.*, 2001). Les embryons injectés avec $\geq 0,05$ pg de cette fusion sont morts dans les premières heures de leur développement avec de graves malformations. La réduction des quantités injectées de l'ARN conduit à une diminution des malformations mais ne les abolit pas. Pour surmonter ce problème résultant de l'expression des toxines dans les cellules somatiques, Slanchev *et al.* ont choisi d'utiliser un système qui permet l'ablation des CGP en protégeant les cellules somatiques de la toxine (Slanchev *et al.*, 2005). C'est un système procaryotique *parD* qui se compose d'une toxine, *kid*, et d'un antitoxine, *kis*. Dans les cellules exprimant la protéine Kid, la croissance cellulaire est inhibée, alors que la co-expression de Kis inactive la toxine et neutralise cet effet. Les résultats obtenus ont montré que les paires toxine-antitoxine (Kid-Kis) peuvent être utilisées avec succès pour affiner la spécificité de l'action toxique à une population cellulaire bien définie ; les CGP dans cette étude.

La deuxième méthode consiste à utiliser des oligonucléotides anti-sens MOs dirigés contre le gène « *dead end (dnd)* » essentiel pour la migration et la survie des CGP ; les embryons dépourvus de cette protéine deviennent des adultes stériles (Slanchev *et al.*, 2005). Chez ces derniers, la structure gonadique apparaît initialement de petite taille et histologiquement uniforme. Aucune gonade n'a été observée à 90 jpf chez les poissons injectés de *dnd*-MOs, ce qui suggère que les gonades dégénèrent en l'absence de CG. Par conséquent, les résultats démontrent que chez le poisson zèbre, les CG ne sont pas nécessaires pour la formation de la gonade, mais elles sont plutôt essentielles pour la différenciation et la survie de cet organe. Les deux méthodes conduisent non seulement à une stérilité mais aussi à une inversion sexuelle femelle-mâle : en effet, les adultes semblent mâles d'un point de vue morphologique et comportemental. En plus, les gènes « mâles-spécifiques » *sox9a* et *amh* ainsi que le marqueur des cellules de Leydig *cyp11b* sont maintenus, tandis que les gènes « femelles-spécifiques » tels que *foxl2* et *aromatase* sont inhibés (Siegfried & Nüsslein-Volhard, 2008). Donc, la lignée germinale est essentielle pour le développement femelle, alors que son rôle

chez les mâles est encore en débat : la gonade dépourvue de CG reste plutôt indifférenciée pour les uns (Slanchev *et al.*, 2005), alors que la formation de tubules testiculaires est normale pour les autres (Siegfried & Nüsslein-Volhard, 2008).

Il est probable qu'un seuil des CG est nécessaire pour la différenciation ovarienne chez les poissons. En effet, l'homozygotie pour l'allèle nul *piwi* (*ziwi*) du poisson zèbre cause une perte complète de CG et donne 100% de mâles phénotypiques (Houwing *et al.*, 2007). Chez le medaka porteur de la mutation *hotei* dans le gène de l'*amhr-II*, les CGP prolifèrent excessivement et provoquent une inversion mâle-femelle (Morinaga *et al.*, 2007). Sur la base de ces résultats, les CG en prolifération agissent soit pour recruter des cellules bipotentielles vers des cellules de la granulosa ou pour réprimer le développement masculin (DeFalco & Capel, 2009).

Cependant, ce rôle n'est pas retrouvé chez tous les poissons. Par exemple, il a été récemment, montré chez la loche, *Misgurnus anguillicaudatus*, que les individus déficients en CG suite à une injection de (*dnd*-MO) pourraient se développer comme des mâles ou des femelles phénotypiques ayant des structures testiculaires et ovariennes, respectivement, similaires aux poissons témoins, mais sans CG. Enfin, contrairement à la situation chez d'autres espèces de poissons, les cellules somatiques dans les gonades chez les femelles phénotypiques de la loche se différencient de façon autonome en tissus ovariens et jouent également un rôle dans le maintien de la structure des gonades (Fujimoto *et al.*, 2010).

IV.3.2.4) Chez les amphibiens

L'absence de CG a été étudiée uniquement chez les anoues (Wylie *et al.*, 1976; Piprek *et al.*, 2012). Wylie et ses collègues (1976) ont réalisé une irradiation UV des œufs fécondés de *X. laevis* et analysé ses effets sur les stades précoces et le développement des crêtes génitales. Ils ont observé que seulement des masses inorganisées de cellules somatiques sont formées et se différencient indépendamment lorsque les CG ont été éliminées. Les stades ultérieurs du développement n'ont pas été étudiés.

Des traitements au Bu ont aussi été effectués. Chez la majorité des espèces étudiées (*B. bombina*, *H. arborea*, *B. viridis*, et *R. temporaria*), ce type de traitement entraîne une déplétion partielle des CG, des malformations somatiques ainsi qu'une augmentation de la mortalité au cours de métamorphose. En revanche, *X. laevis* est la seule espèce dans laquelle le Bu (30 mg/L administré à des larves au stade 45 NF (selon Nieuwkoop et Faber)) a conduit à une absence totale de CG sans effets dégénératifs ni sur les tubules séminifères ni sur le

Effet de l'absence de CG sur la différenciation gonadique				
Traitement administré aux stades fœtaux et embryonnaires				
Espèce	Méthode	Effet sur le testicule	Effet sur l'ovaire	Réf.
Mammifères (souris/rat)	Injection ip Bu (10 mg/kg)	Tubes séminifères ; différenciation normale des cellules de Sertoli.	Formation de cordons ovigères stériles et prolifération normale des cellules somatiques.	Hemsworth & Jackson, 1962; 1963a; 1963b; Merchant, 1975
	Mutation (WW/WW ^v)	Formation de tubules séminifères stériles et production normale des hormones mâles.	Formation gonadique normale.	Mintz & Russell, 1957; Merchant-Larios & Centeno, 1981
	Irradiation γ	Pas d'études effectuées.	Prolifération normale des cellules somatiques. Les cordons ovigères ne se décomposent pas en follicules et persistent quelques semaines après la naissance avant régression. Follicules multi-ovocytes dus à rupture incomplète des CO.	Mazaud <i>et al.</i> , 2002; Mazaud Guittot <i>et al.</i> , 2006; Guigon & Magre, 2006
Oiseaux (poulet)	Excision du croissant germinale antérieur	Développement normal (cordons testiculaires) et différenciation fonctionnelle des éléments somatiques, formation normale du tractus génital et production des hormones mâles.	Développement normal du compartiment somatique (expansion corticale normale), formation normale du tractus génital et production des hormones femelles.	McCarrey & Abbott, 1978; 1982
	Irradiation X	Les rayons X augmentent la transmission de la lignée germinale transférée chez les chimères de poulet.	Les rayons X augmentent la transmission de la lignée germinale transférée chez les chimères de poulet.	Aige-Gil & Simkiss, 1991; Atsumi <i>et al.</i> , 2009; Park <i>et al.</i> , 2010; Nakamura <i>et al.</i> , 2012
Reptiles (Tortue)	Bu (20 mg/kg)	Formation normale des cordons testiculaires avec augmentation de prolifération des cellules de Sertoli.	Morphologie cellulaire normale ; cortex, médulla et lacunes.	DiNapoli & Capel, 2007
Poissons	MO	Medaka : Expression normale des gènes « mâles-spécifiques ». Poisson-zèbre : Expression des gènes « mâles-spécifiques » (<i>sox9a</i> et <i>amh</i>). Loche : Pas d'influence. Poisson rouge : Pas d'influence.	Medaka : Incapacité à maintenir les cellules de granulosa ou les cellules productrices d'E ₂ , réduction de l'expression des gènes « femelles-spécifiques », pas de follicules. Poisson-zèbre : Inhibition des gènes « femelles-spécifiques », pas de follicules. Loche et Poisson rouge : Pas d'influence.	Kurokawa <i>et al.</i> , 2007; Siegfried & Nüsslein-Volhard, 2008; Slanchev <i>et al.</i> , 2005; Fujimoto <i>et al.</i> , 2010; Goto <i>et al.</i> , 2012
Amphibiens anoures	Irradiation UV	Masses inorganisées de cellules somatiques qui se différencient indépendamment des CG.	Formation de masses inorganisées de cellules somatiques qui se différencient indépendamment des CG.	Wylie <i>et al.</i> , 1976
	Bu (30 mg/L)	Formation d'un testicule avec de très nombreuses cellules de sertoli	Ovaire avec cavité et matrice extracellulaire importante entre les deux couches de cellules.	Piprek <i>et al.</i> , 2012

Tableau 4 : Effet de l'absence de CG sur la différenciation gonadique pendant les stades fœtaux et embryonnaires.

compartiment somatique chez les têtards. L'existence de la structure gonadique, malgré l'absence de CG ainsi que le taux élevé de survie font de *X. laevis* un bon modèle pour étudier le rôle des CG sur le développement gonadique (Piprek *et al.*, 2012). En plus de la perte de CG, le Bu chez les anoues induit une diminution de la taille des gonades, un retard considérable de développement et une tendance à la dégénérescence des gonades après la métamorphose. Ce traitement donne des individus matures mais stériles.

Par ailleurs, Piprek *et al.* ont montré que chez toutes les espèces étudiées, les crêtes génitales se forment normalement. En plus, ils ont observé l'absence totale de CGP lors de la formation des crêtes génitales seulement chez *X. laevis*. Cela indique que ce n'est pas la migration des CGP vers les sites des gonades qui a induit la formation des crêtes génitales.

Le développement testiculaire se poursuit malgré l'absence de CG chez *X. laevis*. En effet, des lumières apparaissent parmi les cellules de Sertoli formant au cours de la métamorphose des tubes séminifères dans les testicules. En plus, comme chez la tortue *T. scripta*, il est intéressant de noter qu'en absence de CG chez *X. laevis*, le nombre de cellules de Sertoli dans les testicules traités au Bu est augmenté. En outre, ces cellules somatiques testiculaires sont plus nombreuses dès le début du développement gonadique. Ces résultats suggèrent que les CG inhibent la prolifération excessive des cellules de Sertoli. A contrario, au cours de la différenciation ovarienne chez les têtards de *Xenopus* traités au Bu, les cellules somatiques forment uniquement une seule couche mince dans le cortex. D'ailleurs, ni l'épithélium ovarien, ni les follicules ne sont formés chez les individus traités au Bu, ce qui suggère que le développement de ces structures est induit par les CG et que ces CG sont présentes dans l'ovaire pour former l'épithélium folliculaire qui constitue, avec les ovocytes, les follicules ovariens. Contrairement aux mammifères et aux poissons, aucun signe d'une inversion sexuelle n'a été observé au cours du développement ovarien chez les anoues après l'ablation des CG. En conclusion, cette étude montre que chez les anoues, les CG ne sont pas nécessaires pour la formation du testicule, mais elles sont cruciales pour le développement des ovaires ainsi qu'elles sont essentielles pour le maintien de la structuration des gonades (Piprek *et al.*, 2012).

Les tableaux 4 et 5 récapitulent l'effet de la déplétion des CG sur la différenciation gonadique chez différents vertébrés lorsque cette déplétion est réalisée pendant les stades fœtaux/embryonnaires ou le stade adulte, respectivement. Aucune donnée n'est disponible sur le rôle de CG au cours du développement gonadique chez les urodèles.

Effet de l'absence de CG sur la différenciation sexuelle gonadique				
Observation ou administration au stade adulte				
Espèces	Méthode	Effet sur le testicule	Effet sur l'ovaire	Réf.
Mammifères (souris/rat)	Injection ip Bu (30 mg/kg)	Tubules séminifères stériles. Cellules de Sertoli exprimant des gènes spécifiques (<i>Dhh</i> , <i>Wt1</i> , <i>Gata1</i> et <i>Sox9</i>). Cellules de Leydig (Star et <i>Cyp11a1</i>). Testostérone.	Pas d'études effectuées.	O'Shaughnessy <i>et al.</i> , 2003; 2008
	Mutation	Différenciation et maturation normales des cellules de Sertoli.	Dégénérescence folliculaire et formation de cordons séminifères dans l'ovaire	Coulombre & Russell, 1954; Handel & Eppig, 1979; Merchant-Larios & Centeno, 1981; Vainio <i>et al.</i> , 1999; Couse <i>et al.</i> , 1999; Britt <i>et al.</i> , 2002
	Irradiation γ	Pas d'études effectuées.	Inversion sexuelle : cordons séminifères, cellules « Sertoli-like » exprimant les gènes « femelles-spécifiques ».	Guigon <i>et al.</i> , 2005
Oiseaux (poulet)	Irradiation $\gamma/\text{♂}$ 3H-thymidine/ ♀	Morphologie testiculaire normale avec des cellules de Sertoli dans des tubes séminifère et des cellules de Leydig	Masculinisation du plumage externe ; formation d'ovaires anormaux caractérisés par des structures tubulaires analogues à des tubules séminifères.	Callebaut, 1968; 1969; Trefil <i>et al.</i> , 2003; 2006
Reptiles	Pas d'études effectuées.			
Poissons	Bu (25 $\mu\text{g/ml}$)	Medaka : Précurseurs des tubes séminifères avec lame basale et desmosomes.	Medaka : Pas de follicules, mais présence d'une cavité ovarienne bien développée.	Shinomiya <i>et al.</i> , 2001
	MO	Medaka : Formation de tubules testiculaires; pigmentation normale des adultes mâles et comportement de reproduction normal. Poisson-zèbre : Caractères sexuels secondaires masculins. Absence de structures gonadiques chez les adultes. Loche : Différenciation testiculaire normale ; Expression normale des gènes «mâles-spécifiques» (<i>dmrt1</i>). Chez le poisson rouge : Différenciation testiculaire normale. Différenciation normale des cellules de Sertoli, expression normale des gènes «mâles-spécifiques» (<i>amh</i>).	Medaka : Inversion sexuelle, caractères sexuels secondaires masculins externes, augmentation des androgènes et réduction du 17β-œstradiol, expression des gènes «mâles-spécifiques», Inhibition des gènes «femelles-spécifiques». Poisson-zèbre : Inversion sexuelle, morphologie et comportement mâle, expression des gènes «mâles-spécifiques», inhibition des gènes «femelles-spécifiques». Loche : Différenciation ovarienne normale, lumière ovarienne ; maintien des structures somatiques, expression normale de gènes «femelles-spécifiques». Poisson rouge : Différenciation ovarienne normale avec cavité claire, vaisseaux sanguins et tissu conjonctif ; différenciation normale des cellules de granulosa, expression normale des gènes «femelles-spécifique».	Kurokawa <i>et al.</i> , 2007; Siegfried & Nüsslein-Volhard, 2008; Slanchev <i>et al.</i> , 2005; Fujimoto <i>et al.</i> , 2010; Goto <i>et al.</i> , 2012
Amphibiens anoures	Bu (30 mg/L)	Structures testiculaires altérées, réduction de la taille des gonades et du nombre de tubes séminifères. Grand corps gras.	Cavité ovarienne entourée de deux couches cellulaires avec grande quantité de matrice extracellulaire	Piprek <i>et al.</i> , 2012

Tableau 5 : Effet de l'absence de CG sur la différenciation sexuelle gonadique au stade adulte.

OBJECTIFS DE LA THESE

Notre laboratoire étudie depuis de nombreuses années la différenciation sexuelle de l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*. Ce modèle d'étude présente l'intérêt de posséder les deux types de détermination du sexe, GSD et ESD. En effet, l'augmentation de la température d'élevage est masculinisante et le traitement par des hormones stéroïdes pendant le développement larvaire induit une inversion sexuelle, féminisante avec les œstrogènes et masculinisante avec les androgènes non aromatisables.

Avant mon arrivée au laboratoire, les études avaient porté en majorité sur la différenciation ovarienne en analysant l'aromatase impliquée dans la synthèse des œstrogènes, et d'autres gènes susceptibles d'agir en amont de celle-ci comme *sf1* (Kuntz *et al.*, 2003a, 2003b, 2006). Ensuite, afin d'avoir plus d'informations sur la période de sensibilité aux œstrogènes et leur mode d'action, une étude sur le gène codant le récepteur alpha des œstrogènes (*ERα*) a été réalisée en clonant ce gène et analysant son expression spatio-temporelle lors du développement normal et lors d'une inversion masculinisante produite par la température (Ko *et al.*, 2008). Par la suite, une autre étude a été effectuée visant à une meilleure compréhension de l'entrée en méiose des CG chez le pleurodèle et du rôle de l'acide rétinoïque (AcR) ainsi que des hormones stéroïdes dans ce processus. Cette étude a démontré que les CG entrent en méiose plus tôt dans l'ovaire que dans le testicule. Elle a également montré que les hormones stéroïdes modulent la synthèse et la dégradation de l'AcR (Wallacides *et al.*, 2009).

En ce qui concerne la différenciation testiculaire chez le pleurodèle, elle avait été surtout étudiée morphologiquement et histologiquement. La différenciation de la gonade mâle est régionalisée se poursuit tout au long de la vie, le testicule du pleurodèle étant comme celui des urodèles qualifié de testicule multiple (Flament *et al.*, 2009). Cependant, au moment où cette thèse a débuté, aucune étude sur des gènes marqueurs de la différenciation testiculaire précoce n'avait été publiée. Le gène *dmrt1* n'est mâle spécifique qu'après la métamorphose, au moment de l'entrée en méiose des spermatogonies. Le gène *sox9* avait été cloné mais l'étude de son expression était incomplète. Une étude de parabioses embryonnaires reproduisant l'effet free-martin suggérait l'existence de l'*amh* mais cela était surprenant au vu de la persistance des canaux de Müller chez les mâles.

Les objectifs de ma thèse étaient donc de caractériser l'expression de deux gènes habituellement associés au processus de différenciation testiculaire chez la plupart des vertébrés afin de mieux comprendre ce processus chez le pleurodèle. Nous envisagions d'étudier différentes conditions : développement gonadique normal, inversion sexuelle

produite par la température ou par les hormones stéroïdes, et enfin développement gonadique en absence de CG.

Dans ce but, nous nous sommes tout d'abord focalisés sur le gène codant le facteur de transcription *sox9*. Nous avons analysé son expression spatio-temporelle lors du développement normal et d'une inversion sexuelle masculinisante.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'*amh*. Nous avons cloné partiellement le gène et analysé son expression au cours du développement normal ou d'une inversion sexuelle (masculinisante ou féminisante).

Ces deux gènes ainsi que l'aromatase ont aussi été étudiés lors de traitements de larves de pleurodèle au Bu afin de comprendre le rôle de CG dans la différenciation gonadique. Pour ce faire, le gène *vasa*, marqueur de CG a été cloné, et nous avons réalisé une étude histologique et moléculaire au cours du développement gonadique.

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme de trois articles et de données supplémentaires. Chaque partie est précédée d'une introduction brève situant les principales données décrites chez les autres espèces. Enfin, les résultats obtenus sont discutés dans le chapitre «Discussion, Conclusions et Perspectives».

RESULTATS

I. Etude de deux marqueurs potentiels de la différenciation testiculaire (Sox9-Amh) chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*

La première étape de mon projet de thèse a été d'étudier l'expression des gènes *sox9* et *amh* chez l'amphibien *P.waltl*, puisqu'ils sont associés à la différenciation testiculaire chez de nombreux vertébrés. Ce travail est présenté sous forme de deux articles, l'un paru dans Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.) 316:199–211, 2011 et l'autre paru dans Endocrinology 154:3931–3936. Des résultats supplémentaires sont décrits après l'article 2.

I.1) Etude de l'expression de Sox9 au cours de la différenciation sexuelle chez l'amphibien *Pleurodeles waltl*

I.1.1) Introduction

SOX9 est un facteur de transcription à domaine HMG impliqué dans différents processus d'organogenèse chez les vertébrés, notamment la détermination du sexe et la différenciation gonadique.

Chez les mammifères, SOX9 a un rôle bien décrit dans la chondrogénèse et la détermination du sexe. En effet, les mutations hétérozygotes de *SOX9* engendrent chez l'homme la dysplasie campomélique et une inversion de sexe chez 75 % des individus XY (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). En plus, l'inactivation de *Sox9* induit une inversion mâle-femelle chez la souris (Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2006) et l'homme (Wagner *et al.*, 1994; Smyk *et al.*, 2007), alors que la duplication ou la surexpression de ce gène dans les gonades XX résulte en une inversion masculinisante (Huang *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001) précédée par le développement d'un ovo-testicule embryonnaire composé d'une région centrale testiculaire et de pôles ovariens (Gregoire *et al.*, 2011). SOX9 peut donc fonctionnellement remplacer SRY pour induire la différenciation testiculaire (Bergstrom *et al.*, 2000).

Sur le plan moléculaire, chez les mammifères, lorsque le gène *Sry* atteint son pic d'expression à 11.5 jpc chez la souris, l'ARNm *Sox9* augmente chez le mâle et de façon concomitante dans les cellules pré-Sertoli, tandis qu'il diminue chez la femelle et disparaît à 12,5 jpc (Kent *et al.*, 1996; Sekido *et al.*, 2004). Récemment, il a été démontré que SRY

active directement la transcription de *Sox9* (Sekido & Lovell-Badge, 2008). Suite à son activation, SOX9 est transloquée dans le noyau où elle va activer ses gènes cibles dont celui codant l'*Amh* dans les cellules de Sertoli, clôturant ainsi les étapes regroupées sous le terme de détermination du sexe (de Santa Barbara *et al.*, 1998a; Arango *et al.*, 1999).

Sox9 a aussi été étudié lors de la différenciation gonadique chez les vertébrés non mammaliens (Morrish & Sinclair, 2002). Chez les oiseaux, SOX9 est surexprimé dans les gonades mâles mais cela s'observe après le début de la différenciation gonadique chez le poulet (Kent *et al.*, 1996; Oreal *et al.*, 1998; Vaillant *et al.*, 2001a; Takada *et al.*, 2006). Chez les reptiles, une expression dimorphique des ARNm de *sox9* a été observée au début de la période thermosensible chez la tortue *Trachemys scripta* (Shoemaker *et al.*, 2007), mais elle ne survient qu'à la fin de la période thermosensible chez la tortue *Lepidochelys olivacea* (Moreno-Mendoza *et al.*, 1999), le gecko léopard (Valleley *et al.*, 2001) ou encore l'alligator (Western *et al.*, 1999b).

Le rôle de *Sox9* dans la détermination du sexe est encore plus incertain chez les anamniotes car les transcrits de *sox9* sont présents dans les gonades en développement et adultes dans les deux sexes chez les poissons (Yokoi *et al.*, 2002; Nakamoto *et al.*, 2005) et les amphibiens (Takase *et al.*, 2000; Osawa *et al.*, 2005). Bien que ces études suggèrent que *Sox9* ne joue pas un rôle dans la détermination du sexe masculin, elles n'excluent pas que *Sox9* pourrait avoir un rôle conservé dans la différenciation des gonades.

En outre, la régulation de l'expression de l'*Amh* par SOX9 pourrait sensiblement varier selon les espèces. En effet, l'expression de *sox9* débute soit avant celle de l'*amh* comme chez le poison-zèbre (Siegfried, 2010) ou la tortue *Trachemys scripta* (Shoemaker *et al.*, 2007), soit suite à celle de l'*AMH* comme chez le poulet (Oreal *et al.*, 1998; Vaillant *et al.*, 2001a), quelques reptiles (Western *et al.*, 1999a; b; Valleley *et al.*, 2001) et le tilapia (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005), suggérant que SOX9 ne peut pas conduire la régulation de l'*amh* chez ces espèces.

Chez les amphibiens, seuls les anoues ont été étudiés. Chez *Rana rugosa*, deux isoformes d'ARNm (*sox9α* et *β*) ont été isolés du testicule adulte (Takase *et al.*, 2000). Au cours du développement, les deux isoformes sont présentes dans les gonades des deux sexes et l'expression testicule-spécifique n'apparaît que deux mois après la métamorphose au stade juvénile (Takase *et al.*, 2000). Chez *Xenopus laevis*, la situation est similaire chez les têtards, où les ARNm de *sox9* sont détectés dans les complexes GM du stade 53 au stade 56 aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Osawa *et al.*, 2005). Chez *Bufo marinus*, le niveau des messagers *sox9* est identique entre l'ovaire et le testicule au moment de la métamorphose considéré comme le moment de la différenciation pré-sexuelle (Abramyan *et al.*, 2009).

L'expression est plus élevée chez les mâles au stade 20 mm mais cela s'inverse en une expression enrichie chez les femelles au stade 60 mm (Abramyan *et al.*, 2009). Chez *Xenopus tropicalis*, à l'inverse de ces deux espèces, l'expression de Sox9 (ARNm ou protéine) n'est détectée qu'à la métamorphose, lorsque les gonades sont bien différenciées (El Jamil *et al.*, 2008). Dans le testicule, la protéine Sox9 a été détectée dans le noyau des cellules Sertoli-like. Ces résultats indiquent que Sox9 joue un rôle dans le développement gonadique mais pas dans la détermination sexuelle. En outre, chez *Xenopus tropicalis*, la protéine Sox9 a été détectée dans l'ovaire avec une localisation cytoplasmique dans les ovocytes pré-vitellogéniques mais nucléaire dans les ovocytes vitellogéniques (El Jamil *et al.*, 2008).

Chez le pleurodèle, au laboratoire, Sandra Kuntz avait cloné un cDNA partiel de *sox9* pendant sa thèse et analysé l'expression au cours de la différenciation gonadique par PCR semi-quantitative. La séquence avait été complétée ultérieurement par Hélène Dumond. J'ai complété ce travail préliminaire.

I.1.2) Principaux résultats

L'ADNc *sox9* du pleurodèle a été isolé en plusieurs étapes. La partie 3' a été obtenue grâce à une banque d'ADNc d'embryons de pleurodèles réalisée sur des embryons au stade bourgeon caudal dans le vecteur λ ZAP II et qui avait été aimablement fournie par le Dr J.F. Riou de l'université Paris VI. La partie 5' a été obtenue en utilisant les approches de RACE-PCR (*Rapid amplification of cDNA Ends*) et PCR dégénérée. Ce gène comporte une ORF (GenBank EU872027) de 3 376 pb codant une protéine de 479 aa et présentant une forte homologie (83% à 81%) avec celle des amphibiens anoures et des reptiles. L'identité est ensuite de 79%, 77%, 73% avec la souris, le poulet et le medaka respectivement. Les trois domaines conservés ont été retrouvés chez notre modèle : le domaine HMG de liaison à l'ADN, le domaine de liaison avec la protéine HSP70 et le domaine de trans-activation PQS dans la partie C-terminale de la protéine, alors que le domaine PQA est absent chez le pleurodèle comme chez les poissons, la grenouille, l'alligator et les oiseaux.

Chez les larves, à cause de la petite taille des gonades, les études ont été souvent réalisées sur le complexe GM. Chez les larves ZZ²⁰, ZW²⁰ et ZW³², les analyses par RT-PCR ont révélé une expression de *Sox9* dès le stade 42 qui est maintenue tout au long la période thermosensible. Aucune différence significative n'a été observée dans les complexes GM des larves aux stades 54 et 54+60j. Au stade 54+60j, nous avons pu séparer les gonades du

mésonephros et les avons analysées par PCR en temps réel. L'expression est six fois plus élevée dans le testicule (ZZ²⁰, ZW³²) que dans l'ovaire (ZW²⁰).

Au niveau protéique, nous avons également étudié l'expression Sox9 en utilisant un anti-SOX9 humain, qui nous a été gracieusement fourni par le docteur Brigitte Boizet-Bonhoure (Montpellier). Nous avons montré que cet antisérum est capable de détecter la partie N-terminale (100 AA) de PwSox9 lorsqu'elle est exprimée en tant que protéine de fusion avec la thiorédoxine en utilisant un vecteur d'expression bactérien. Lorsque nous avons testé cet anticorps par western blot sur des complexes GM mâles au stade 54+60j de *P. waltl*, il a révélé une seule bande à une masse moléculaire plus petite (65 kDa contre 72 kDa) que celle révélée dans le testicule de souris de 13.5 jpc utilisé comme témoin. Nous avons ensuite examiné, par cet anticorps, l'expression de PwSox9 aux niveaux cellulaire et subcellulaire par immunofluorescence. A la fin de la métamorphose (au stade 56), l'expression a été observée dans les mésonephros au niveau du cytoplasme des cellules des tubules mésonephrétiques des deux sexes. Dans le testicule, un marquage nucléaire a été observé dans les cellules somatiques et les CG, tandis que dans l'ovaire, PwSox9 se localise dans le cytoplasme de ces deux types de cellules.

Sox9 est exprimée dans le testicule et l'ovaire adulte. Nous avons aussi effectué une analyse plus détaillée de l'expression Sox9 dans les ovocytes de *P. waltl*. Nous avons montré que les ovocytes folliculés du stade I au stade VI présentent une expression identique de Sox9. Ensuite, les ovocytes (au stade VI) défolliculés et énucléés ont montré un profil similaire à celui des ovocytes folliculés, alors que cette expression est absente dans les noyaux ovocytaires. Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie : un marquage cortical est observé dans des ovocytes de stade VI mais aucun marquage n'a jamais été observé ni dans les noyaux des ovocytes ni dans les cellules folliculaires.

I.1.3) Conclusion

Nous avons isolé un ADNc de *sox9* du pleurodèle. La protéine déduite se sépare du groupe des anoues et se lie plus étroitement aux amniotes qu'aux anamniotes. Cependant, SOX9 est dépourvu du domaine PQA présent chez les amniotes.

Chez les larves, *sox9* est exprimé dans les complexes GM des deux sexes dès le stade 42, qui est bien antérieur à la différenciation gonadique. Au stade 54+60j, où la différenciation testiculaire est déjà bien avancée, les analyses quantitatives faites sur des gonades isolées

révèlent une expression de *sox9* fortement enrichie dans les testicules. A la fin de la métamorphose (stade 56), Sox9 ne montre une localisation nucléaire que dans les testicules.

Chez les adultes, Sox9 s'exprime également dans les testicules et les ovaires. Dans l'ovaire, Sox9 se trouve dans le cytoplasme des ovocytes du stade I au stade VI.

Nos résultats suggèrent que chez *P. waltl*, comme chez d'autres vertébrés non mammaliens, Sox9 pourrait jouer un rôle au cours de la phase tardive de la différenciation des gonades plutôt que dans la détermination du sexe. Son rôle dans la différenciation ovarienne et en particulier dans l'ovogenèse doit encore être élucidé.

Article 1.

Temporal and Spatial *SOX9* Expression Patterns in the Course of Gonad Development of the Caudate Amphibian *Pleurodeles waltl*



HÉLÈNE DUMOND¹, IMANE AL-ASAAD¹, AMAND CHESNEL¹, DOMINIQUE CHARDARD¹, BRIGITTE BOIZET-BONHOURE², STÉPHANE FLAMENT^{1*}, AND SANDRA KUNTZ¹

¹EA 4421: Signalisation Genomique et Recherche Translationnelle en Oncologie, Nancy-Université, Nancy, France

²Department of Genetics and Development, Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR1142, Montpellier, Cedex, France

ABSTRACT

The *SOX* family of transcription factors is thought to regulate gene expression in a wide variety of developmental processes. Namely, *SOX9* expression is conserved in vertebrate sex determination or differentiation. Nevertheless, information about caudate amphibians is lacking. In this study, we provide data on *Pleurodeles waltl*, a species that displays a ZZ/ZW genetic mode of sex determination and a temperature-dependent mechanism of female-to-male sex reversal. Phylogenetic analysis of *SOX9 P. waltl* ortholog reveals that the deduced protein segregates from the group of anuran and could be more closely related to amniote than to anamniote. However, *SOX9* lacks the PQA-rich domain present in amniotes. In larvae, *SOX9* is expressed in both sexes in gonad-mesonephros complexes as soon as stage 42, before gonad differentiation. At stage 54^{60d} at which testis differentiation is already in progress, analyses of isolated gonads reveal a male-enriched expression of *SOX9*, which was quantified by real-time PCR. At the end of metamorphosis (stage 56), *SOX9* shows a nuclear localization only in the testis. In adults, *SOX9* is still expressed in testes and ovaries. In the ovary, *SOX9* is found in oocytes from stage I to stage VI but it is never detected in the nucleus. Our results suggest that in *P. waltl*, like in non mammalian vertebrates, *SOX9* could play a role during the late phase of gonad differentiation rather than in sex determination. Its role in germ cells of the adult ovary has still to be elucidated. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 316:199–211, 2011. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

How to cite this article: Dumond H, Al-Asaad I, Chesnel A, Chardard D, Boizet-Bonhoure B, Flament S, Kuntz S. 2011. Temporal and spatial *SOX9* expression patterns in the course of gonad development of the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 316:199–211.

J. Exp. Zool.
(*Mol. Dev. Evol.*)
316:199–211, 2011

Vertebrates have developed complex and various sex determination processes although main actors have been conserved over the course of evolution. For instance, doublesex-mab3 related transcript-1 (Raymond et al., '98), fibroblast growth factor-9 (Kim et al., 2006), or steroidogenic factor-1 (Western et al., 2000) are common to different vertebrate models. A major element of this developmental process is *SOX9* gene, encoding an SRY-like high-mobility group (HMG) box containing transcription factor. *SOX9* participates in a number of developmental processes, such as

Grant Sponsors: Université Henri Poincaré (BQR); Ligue contre le Cancer; Conseil Régional de Lorraine; Nancy-Université; Association pour la Recherche sur le Cancer; FEDER.

Hélène Dumond and Imane Al-Asaad contributed equally to this work.

*Correspondence to: Stéphane Flament, Faculté des Sciences, Nancy-Université, EA4421: SIGRETO, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France.

E-mail: stephane.flament@scbiol.uhp-nancy.fr

Received 16 June 2010; Revised 25 October 2010; Accepted 27 October 2010

Published online 8 December 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jez.b.21390

chondrogenesis, and differentiation of neural crest (Hong and Saint-Jeannet, 2005), otic ectoderm (Barrionuevo et al., 2008), or prostate bud epithelial cells (Thomsen et al., 2008), and it is well known to be involved in gonad development in many species.

SOX9 is required for mammalian testis determination. *SOX9* is expressed at low levels in the cytoplasm of gonadal somatic cells of both sexes during early mouse and human embryogenesis (Moraes da Silva et al., '96; de Santa Barbara et al., 2000). In the XX gonad, *SOX9* remains cytoplasmic and disappears (by 12.5 dpc in the mouse). In the XY gonad, after the expression of *SRY*, *SOX9* mRNA levels are elevated significantly in pre-Sertoli cells and the protein moves to the nucleus to stimulate with other partners suppressor; the expression of anti-Müllerian hormone (AMH), an early marker of Sertoli cell differentiation (de Santa Barbara et al., '98) and regulation of the *SOX9* protein nuclear translocation in male, is a key factor of its activation (Gasca et al., 2002). Mutations in human *SOX9* cause a severe disruption of bone development known as campomelic dysplasia, which is associated with sex reversal in approximately 75% of XY patients (Sim et al., 2008).

The situation is quite different in other vertebrate models of sex determination. For instance, in bird embryos, *SOX9* mRNA is expressed at higher levels in the male gonad but it is expressed after the onset of testis differentiation, later than *AMH* and therefore cannot drive its expression (Oreal et al., '98; Vaillant et al., 2001; Takada et al., 2006). A dimorphic expression was also described in reptiles where *SOX9* is expressed at higher levels at male-producing temperatures. Nevertheless, similar to the situation observed in birds, expression of *SOX9* does not become testis-specific until the end of the thermosensitive period in the American alligator, the leopard gecko, and the olive ridley sea turtle (Moreno-Mendoza et al., '99; Western et al., '99a,b; Valleley et al., 2001). In the red-eared slider turtle, a sexually dimorphic expression of *SOX9* mRNA was observed at the beginning of the thermosensitive period, preceding the dimorphic expression of *AMH* (Shoemaker et al., 2007). In birds and reptiles, the subcellular localization of *SOX9* has not been studied.

In fishes, two *SOX9* genes, named *SOX9a* and *SOX9b/a2*, have been found in several teleosts (including zebrafish, fugu, stickleback, ricefield eel, pufferfish, rainbow trout, and medaka) (Chiang et al., 2001; Yokoi et al., 2002; Koopman et al., 2004; Klüver et al., 2005). However, the testis dominant type of *SOX9* was different in each species (for instance *Sox9a* in zebrafish or tilapia and *Sox9b/a2* in medaka) (Chiang et al., 2001; Klüver et al., 2005; Kobayashi et al., 2008). It seems that *SOX9* did not show sexual dimorphism before the appearance of sex differences in histogenesis, and thus, it is suspected to play a role in gonad structures development rather than sex determination (Nakamoto et al., 2005; Kobayashi et al., 2008).

In amphibians, only the *Anura* order is documented, especially *Xenopus* species in which *SOX9* is involved in many developmental mechanisms. In *Rana rugosa*, two mRNA isoforms (*SOX9 α* and β)

have been isolated from the adult testis (Takase et al., 2000). During tadpole development, both isoforms were found not only in the testis but also in the ovary and a testis-specific expression of *SOX9* mRNA appeared only 2 months after metamorphosis in juvenile animals (Takase et al., 2000). In *Xenopus laevis*, a similar situation was observed: in tadpoles, *SOX9* mRNA was detected in gonad-mesonephros complexes from stage 53 to 56 in both males and females (Osawa et al., 2005). In *Bufo marinus*, *SOX9* mRNA level was identical between ovary and testis at the time of metamorphosis considered as a presexual differentiation time point (Abramyan et al., 2009). A male-enriched expression was observed at the 20-mm stage but it reversed to a female-enriched situation at the 60-mm stage (Abramyan et al., 2009). In contrast to these two species, in *Xenopus tropicalis*, *SOX9* mRNA and protein were not detectable until metamorphosis in both sexes, when gonads are well differentiated (El Jamil et al., 2008). *SOX9* protein was found in the nucleus of Sertoli-like cells in the testis. These results indicating a late dimorphic expression suggest that *SOX9* plays a part in gonadal development but not in sex determination (Takase et al., 2000).

In addition to these testis-associated expression patterns, an adult ovarian expression has also been reported. In the mouse, *SOX9* was transiently expressed in mature ovary depending on the follicular cycle, with a nuclear localization observed only in the inner cells of the theca interna cell layer surrounding pre-antral/antral follicles (Notarnicola et al., 2006). In fishes, in medaka and ricefield eel adult ovaries, *SOX9* mRNA was found in germ cells (Yokoi et al., 2002; Zhou et al., 2003). However, the subcellular localization of *SOX9* has not been studied in detail in fish species. In the anuran amphibian *X. tropicalis*, *SOX9* protein was found in the ovary where the localization was cytoplasmic in previtellogenic oocytes and nuclear in vitellogenic ones (El Jamil et al., 2008). However, the role played by *SOX9* in the ovary in these different species is still unknown.

In caudate amphibians, a complete *SOX9* cDNA has never been described and no data are available on the gonadal expression of this gene. The newt *Pleurodeles waltl* is an interesting model to study amphibian sex determination/differentiation: it displays a ZZ/ZW genetic mode of sex determination, as well as a temperature-dependent mechanism of female-to-male sex reversal (Dumond et al., 2008a). We have cloned a *P. waltl SOX9* ortholog. The deduced amino acid (AA) sequence was compared with those of other species. The spatio-temporal expression of *PwSOX9* was examined at the mRNA and protein levels in gonad/mesonephros complexes from both sexes during development. The expression in adult ovary was also studied.

MATERIALS AND METHODS

Animals

P. waltl larvae and adults were reared at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ in tap water. The ZW or ZZ sexual genotype was determined by electrophoresis patterning of the W- and/or Z-linked peptidase-1 isoforms

(Chardard et al., '95). Developmental stages were determined according to Gallien and Durocher ('57). The long lasting stage 55 was chronologically subdivided into stage 54+30 days (54^{30d}) and stage 54+60 days (54^{60d}). ZW larvae were reared at 32°C from stage 42 to stage 54 (the thermosensitive period) to induce female-to-male sex reversal (Dournon and Houillon, '85).

A 0.03% benzocaine solution (Sigma) was used to anaesthetize larvae or adults in order to harvest gonad-mesonephros complexes or gonads alone. The local Animal Care and Use Committee approved the experimental protocols, and guidelines for laboratory procedures were followed at all terms.

Handling of Oocytes

After ovariectomy, pieces of ovary were incubated in Steinberg's solution (60 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 0.3 mM Ca(NO₃)₂ and 1.4 mM Tris, pH 7.4). Folliculated oocytes were separated from stage I to stage VI according to their size using fine forceps under a dissecting microscope (Bonnanfant-Jais and Mentré, '83). Defolliculated full-grown stage VI oocytes were obtained after a 1-hr incubation in collagenase A (Roche) (1 mg/mL in Steinberg's solution). Enucleation of defolliculated stage VI oocytes was performed under a dissecting microscope. A sharp forceps was used to pick a small opening on the animal pole, and gentle squeezing with a blunt-end forceps facilitated the extrusion of the nucleus. The enucleated oocyte and its nucleus were immediately placed in Eppendorf tubes on ice, until their treatment for protein analysis.

Sequence Isolation

A *P. waltl* SOX9 cDNA 3' moiety was cloned by screening a tailbud stage lambda ZAP II (Stratagene) expression library

kindly provided by J.F. Riou (Laboratoire de Biologie du Développement, Université Paris 6) with a 290-bp PCR fragment given by P. Berta (IGH, Montpellier). The 5' end of the SOX9 ORF was obtained by using (i) the rapid amplification of cDNA ends strategy (SMART RACE cDNA Amplification kit; Clontech, CA) and (ii) the classical PCR method by using the degenerated primer Sx9ATG designed into the well-conserved region encoding the SOX9 N-term aminoacid sequence. Finally, the Universal Genome Walker kit (Clontech) was used to clone a 1,316-bp upstream fragment overlapping the very N-term SOX9 encoding sequence. In the last purpose, the primary and nested PCR were performed with the specific primers Sx9R2 and Sx9R1, respectively (Table 1). The fragment of interest was recovered (QiaEX II kit; Qiagen) and sequenced (Eurogentec).

RT-PCR

The detailed protocol for reverse transcription has been previously described (Kuntz et al., 2003). Total RNA was extracted from pools of five gonad-mesonephros complexes from stage 42 to 54^{60d} or from 20 to 50 mg of adult tissues using 200 µL of TRIzol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and quantified. Total RNA (1 µg or 3 µg for larval or adult tissue respectively) was reverse transcribed using hexamer primers and 100 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 25 µL. A 2 µL aliquot of resultant cDNA was used for PCR.

The amplification was performed with 0.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, and 10 pmol of each primer in a total volume of 25 µL. Specific primers were

Table 1. List of the PCR primers.

Gene	Primer name	Primer sequence
<i>PwSOX9</i>	Sx9ATG	5'-ATGAATCTCCTRGACCCCTTCATGAARATGAC-3'
	Sx9R1	5'-ACTTCTCCTGCTCCTCGGTCATTT-3'
	Sx9R2	5'-TTCCTCGTTCTCTTCTTCAGCTC-3'
	SOX9-3	5'-GAGGGCTCCGAGCAAAACGCAC-3'
	SOX9-4	5'-GCTCTGCTCGCTGCCAGTGT-3'
	Sox9q-dir2	5'-CATGAGCGAGGTGCACTCGC-3'
	Sox9q-rev3	5'-TCAATGTGGGGAGGCTGTCTC-3'
	pET32-Sox9-dir	5'-CCCCGGATCCATGAATCTCCTAGACCCCTTC-3'
	pET32-Sox9-rev	5'-GGGGAAGCTTTTAGCTGGAGCCGTTACCCGCAC-3'
<i>PwP450 Aromatase</i>	Aromq-dir2	5'-CTCATCATCAGCAATCATCAGC-3'
	Aromq-rev2	5'-ATTCCATTTTATTTCATGCCAAC-3'
<i>PwDMC1</i>	DMC1-dir	5'-GCAGTCTCATACACTGTGCGTTAC-3'
	DMC1-rev	5'-CACAGCTACGTTGTACTCTTCAGAG-3'
<i>PwGAPDH</i>	Gapdh3	5'-ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3'
	Gapdh4	5'-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3'
	Gapdhq-dir2	5'-GAAGGTAGTAAGCAACGCCTCTCT-3'
	Gapdhq-rev2	5'-CACAGCATGTACAGTGGTCATCA-3'

Sox9-3 and Sox9-4 leading to a PCR product of 504 bp in length. The PCR conditions were 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 66°C, and 1 min elongation at 72°C. We performed 35 cycles for qualitative analyses and 28 cycles for semi-quantitative analyses. Amplification of *GAPDH* was used as a control and led to a 290-bp fragment. The conditions for the amplification of DMC1 (encoding a recombinase that can be used as a meiosis entry marker to confirm ZW genotype in larvae) have been described previously (Dumond et al., 2008b). Primer sequences are described in Table 1. PCR products were then separated in a 1% agarose gel and transferred to nylon membrane (Hybond-N; Amersham Bioscience Corp, Piscataway, NJ) before hybridization with DIG-labeled probes and detection by chemiluminescence under previously described conditions (Kuntz et al., 2003). The intensity of the hybridization signal was normalized to *GAPDH* by using Gel Doc2000 (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) and a software package (Quantity One v.4.3.1; Bio-Rad).

Quantitative Real-Time PCR

cDNA transcribed from 1 µg of total RNA were diluted at various concentrations to establish the standard curve for quantification before performing *SOX9*, aromatase and *GAPDH* quantitative PCR. All PCR were performed with "Opticon 2 real-time PCR detection system" (Bio-Rad Laboratories) in a final volume of 15 µL. Primers were designed using software Primer 3 (http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi). For *SOX9*, PCR reaction was performed using 300 nM each of forward and reverse primer (Sox9q-dir2 and Sox9q-rev3, Table 1), 7.5 µL iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and 3 µL cDNA. The PCR program included enzyme activation at 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15 sec and 67°C for 45 sec. A similar procedure was used for aromatase and *GAPDH* PCR, using 300 nM of forward and reverse primers (Table 1) and 65°C annealing. Cycle threshold (C_t) values obtained were converted into cDNA (ng) using standard curve plots. Data obtained from duplicated runs for target cDNA amplification were averaged and expressed as quantity (ng). Target gene expressions were normalized with *GAPDH* one, which presented a homogenous level among different samples. Results were represented as mean $\pm$ standard error of several groups as indicated in the figure.

Expression of SOX9 in *Escherichia coli*

The DNA fragment encoding the N-terminal part of SOX9 protein (1–100 AA) was amplified with primer pET32-Sox9-dir containing a BamHI restriction site and primer pET32-Sox9-rev containing a stop codon and a HindIII restriction site. The digested PCR product was inserted into the bacterial expression vector pET-32a (Invitrogen) pre-digested with BamHI and HindIII. The resulting recombinant plasmid, pET-32a-Sox9, contained the SOX9 N-terminus protein sequence fused downstream of the thioredoxin protein (TRX). Electroporation was used

to transform either the recombinant plasmid or the native plasmid (used as a control) into the *E. coli* BL21(DE3) strain (Invitrogen). In each case, a clone was inoculated into liquid LB with 50 mg/mL ampicillin. When the OD₆₀₀ reached 0.6, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (200 mM) was added into the culture, which continued growth at 37°C for 4 hr to induce the expression of TRX-SOX9 (fusion protein) or TRX (control). Cultures were also performed without IPTG addition. The cultures were harvested by centrifugation at 3,000g at 4°C for 5 min. The pellets were re-suspended in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5) containing 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 µM Na vanadate and 1% NP40 with protease inhibitors and lysed by sonication. After centrifugation (10,000g for 15 min at 4°C), supernatants were mixed with 2 $\times$ Laemmli buffer (1V/1V) for their analysis by western blotting.

Western Blotting

Tissues (1/10 w/v) and oocytes (1 oocyte/10 µL) were homogenized on ice in PY lysis buffer (Dumond et al., 2008b). Sonication was used only for tissues (Branson sonifier 150, Branson ultrasonics, Danbury, CT). After centrifugation (10,000g for 10 min at 4°C), supernatants were mixed with 2 $\times$ Laemmli buffer (1V/1V). Nuclei were directly homogenized in Laemmli sample buffer. Total proteins (35 µg per well, i.e. 1 stage VI oocyte or 20 nuclei) were separated on a 12% SDS-PAGE and electrotransferred to an Amersham Hybond-electrochemiluminescence membrane (Amersham Bioscience Corp). The membrane was blocked in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween and 5% bovine serum albumin (BSA), then incubated overnight at 4°C with a polyclonal rabbit serum raised against human SOX9 (Notarnicola et al., 2006), and diluted to 1:1,000 in the blocking buffer or with rabbit polyclonal anti-actin (sc1615-R; SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or anti-tubulin antibody at the same dilution. The secondary anti-rabbit antibody was used following the manufacturer's instructions (Amersham Bioscience Corp). Immunoreactive proteins were detected using enhanced chemiluminescence (ECL kit; Amersham Bioscience Corp).

Microscopy

Gonad-mesonephros complexes were fixed in 4% paraformaldehyde, whereas ovaries from adult females were fixed in Dietrick's fixative (10% formaldehyde 37%, 29% ethanol 95°, and 2% glacial acetic acid). Fixed samples were embedded in paraffin and sectioned at 7 µm. SOX9 protein immunolabelling was performed on sections deparaffinized in Histolemon (CarloErba Corp., Val de Reuil, France) and gradually rehydrated.

In gonad-mesonephros samples, SOX9 was detected using fluorescent secondary antibodies. Slices were incubated with 4% BSA for 10 min at room temperature, incubated for 30 min with SOX9 primary rabbit polyclonal antibody, at the dilution 1:100 and then exposed for 30 min to Alexa fluor 555 goat anti-rabbit

IgG antibody diluted to 1:1,000 (Invitrogen). Finally, DNA was stained with Hoechst 33342 to visualize the nuclei.

In adult ovary samples, due to an intense autofluorescence of yolk platelets, we used biotinylated secondary antibodies and streptavidin–peroxidase. In addition to SOX9, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) was also studied using the PC10 monoclonal antibody (Dako, Trappes, France) as a marker for nuclear staining. Both antibodies were used at 1/250. Detection was performed using the LSAB kit (Dako) according to the manufacturer's instructions.

Stainings were observed under a Nikon 80-i microscope under either white or UV illumination.

Statistics

The differences in *SOX9* mRNA expression were compared after normalization to *GAPDH* mRNA level. The results were expressed as mean $\pm$ SEM of several measurements performed on different pools for each group. The statistical significance was estimated by comparing mean of the relative *SOX9* mRNA expression from each group (ZZ²⁰, ZW²⁰ and ZW³²) by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Bonferroni multiple comparison procedure with SPSS 12.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

PwSOX9 Cloning

An open reading frame-containing 3,376 bp *PwSOX9* partial cDNA (EU872027) was cloned as well as an overlapping 1,316-bp 5' genomic fragment (EU872028) containing numerous presumptive transcription factor binding sites and a putative CpG island (not shown). The PwSOX9 deduced AA sequence containing 479 residues was compared with those obtained from several other species (Fig. 1A). Two partial sequences of *SOX9* were available for *Ambystoma mexicanum*, another caudate amphibian. The first one (AAW81249.1) contained 90 AA corresponding to the carboxyterminus of SOX9 and shared 95% identity with PwSOX9 (residues 391–479). The second one (ABI97015.1) contained 152 AA corresponding to residues 126–281 of PwSOX9 and shared only 59% identity with it. Among other vertebrate SOX9 AA sequences, PwSOX9 showed the highest identities with anuran amphibians (83% with *R. rugosa*, *Bufo gargarizans*, *B. marinus*, and *X. laevis*, 82% with *Bufo bufo* and 81% with *X. tropicalis*) and reptiles (83% with *Lepidochelys olivacea* and 82% with *Alligator mississippiensis*, *Crocodylus palustris*, and *Trachemys scripta*). The identity was lower in birds (77% with *Gallus gallus*, 78% with *Coturnix japonica*, and 82% with *Anas platyrhynchos*), mammals (varying from 75% with *Oryctolagus cuniculus* to 79% with *Mus musculus* or *Rattus norvegicus*) and fishes (72% with *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss* and *Tetraodon nigriviridescens*, 73% with *Gasterosteus aculeatus*, *Oryzias latipes*, *Takifugu rubripes*, and *Salmo salar*). The HMG DNA binding domain of PwSOX9 was highly

conserved: it shared 100% identity with that of *X. laevis* and with several fishes (*O. mykiss*, *S. salar*, *Acipenser sturio*, and *G. aculeatus*). It did not contain the valine substitution (V164I) found in anurans except *X. laevis*. Besides, like in *X. tropicalis*, in the HMG domain, a glycine was present at position 150 instead of a serine in most tetrapods (a threonine is found at this position in *R. rugosa*). This substitution suppresses a conserved PKC phosphorylation site. In several fishes, this AA is often a valine. In *A. mexicanum*, only 55 AA at the C-terminus of the HMG domain were available: this sequence shared 89% identity with those of PwSOX9. Two other domains were conserved: the HSP-binding domain and the N-terminal PQS domain required for transcriptional activity. In PwSOX9, the PQA domain was absent. Surprisingly, on the basis of AA sequence phylogenetic analysis (Fig. 1B), PwSOX9 appeared to be more closely related to amniote than to anamniote SOX9.

Gonadal PwSOX9 Expression in Larvae

Up to stage 54, due to their small size, gonads of *P. waltl* larvae could not be studied alone by RT-PCR and such studies have to be performed in gonad–mesonephros complexes. In ZZ, ZW, and heat-treated ZW larvae, qualitative RT-PCR analyses revealed that *SOX9* mRNA expression was present in the gonad–mesonephros complex as early as stage 42 and that its expression was maintained during the whole thermosensitive period (i.e. from stage 42 to 54) (data not shown).

We also performed semi-quantitative RT-PCR analyses at stage 54 and 54^{60d} (the latter corresponding to the onset of meiosis in females). In gonad–mesonephros complexes, no significant difference in the level of *SOX9* mRNA was observed between ZZ, ZW, and heat-treated ZW larvae (Fig. 2A). At stage 54^{60d}, gonads can be separated from the mesonephros and PCR analyses could be performed on isolated gonads. In ZZ larvae, whose sexual genotype was confirmed by the absence of the recombinase DMC1 (since meiosis entry occurs only after metamorphosis in males), *SOX9* mRNA was expressed at a higher level than in ZW gonads (Fig. 2B). This testis-enriched expression was quantified by real-time PCR: *SOX9/GAPDH* mRNA level was sixfold higher than in the ovary ($P < 0.01$) (Fig. 2C). Besides, an increase in gonadal *SOX9* expression was found in isolated gonads of ZW larvae that had been reared at 32°C during the thermosensitive period: the level was similar to those measured in males and significantly different from those in females ($P < 0.01$) (Fig. 2C). The sex-reversing effect of this treatment was confirmed by the level of aromatase expression which remained as low as in ZZ gonads: the aromatase/GAPDH ratio was 0.27 ± 0.05 in ZZ²⁰ vs. 0.81 ± 0.27 in ZW³², whereas it was 6.21 ± 0.27 in ZW²⁰ control females.

We also studied *SOX9* expression at the protein level using an anti-human SOX9 antibody. First, we verified that this antibody raised against the 62 N-terminal AA of human SOX9 cross-reacted with the amphibian protein. This antiserum was able to

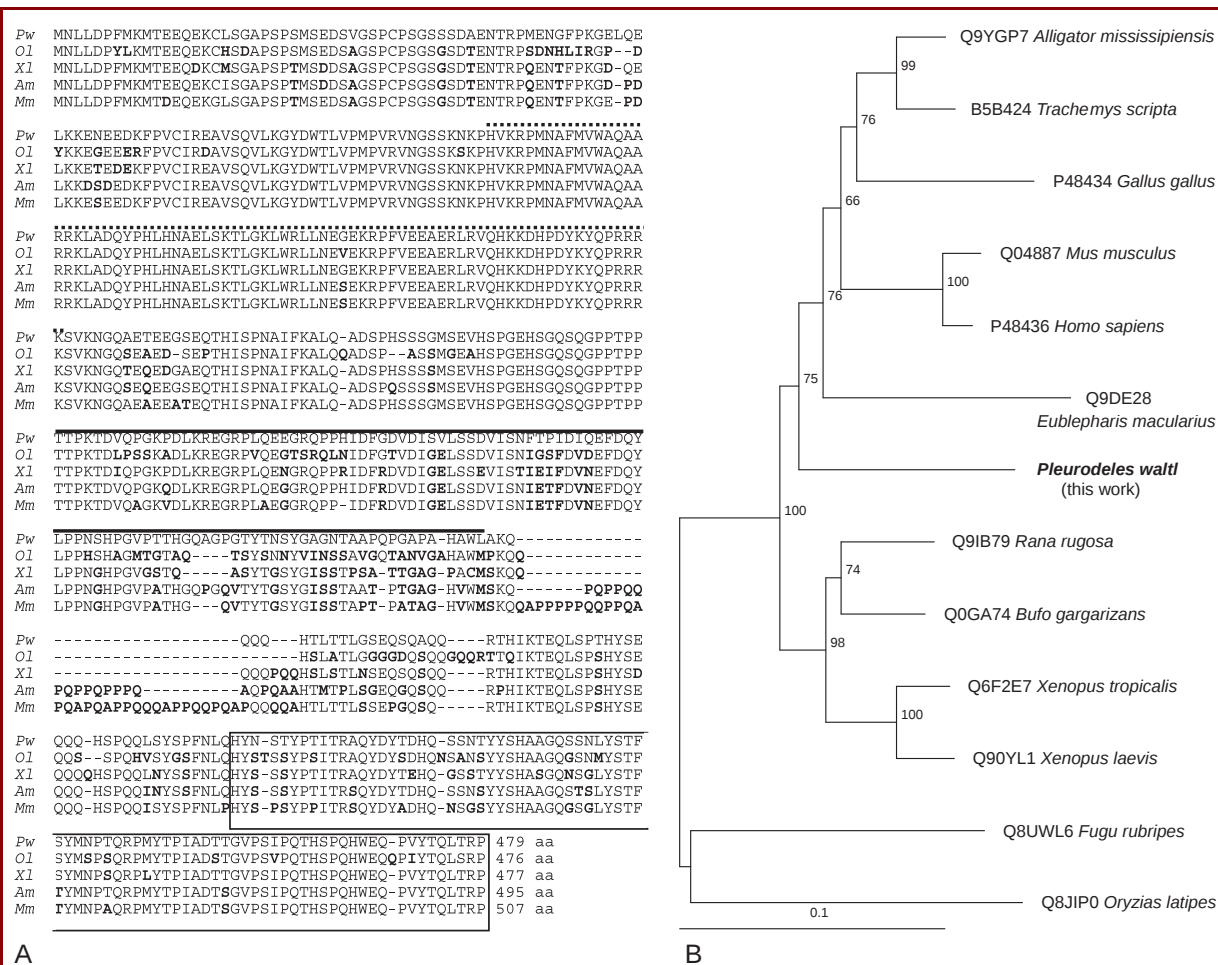


Figure 1. Comparison of AA sequence of SOX9 proteins from different vertebrate species. (A) Sequence alignment created by "Clustal 2.0.8 multiple sequence alignment". The AAs of *Oryzias latipes*, *Xenopus laevis*, *Alligator mississippiensis* and *Mus musculus* sequences that are different from those of the *Pleurodeles waltl* sequence appear in bold. HMG box and HSP70-binding domain are indicated respectively by a dotted line and a full line. The PQS transactivation domain is boxed. (B) Neighbor-joining phylogenetic tree of SOX9 proteins from different species, created by Phylowin program (observed distance, all sites, pairwise removal). We then applied a bootstrap test of 500 replicates to check the robustness of the phylogram. Given are the bootstrapping values and distance scale. AA, amino acid.

detect PwSOX9 N-terminal part when expressed as a fusion protein with thioredoxin using bacterial expression vector (Fig. 3A). Then, we tested the anti-human SOX9 antibody on a *P. waltl* gonad-mesonephros sample by western blotting. The antiserum revealed a single band in the *P. waltl* sample at a smaller molecular mass (65 kDa vs. 72 kDa) than those revealed in mouse testis used as a control, which is consistent with the shorter AA sequence (Fig. 3B). Using this antibody, we examined PwSOX9 expression at the cellular and subcellular levels using immunofluorescence microscopy (Fig. 4). At the end of metamorphosis (stage 56), an expression was observed in the mesonephros: in tubule cells, PwSOX9 was localized into the cytoplasm from both male and female individuals (Fig. 4). In the testis, a nuclear staining was

observed in both somatic and germ cells, the latter also showing a faint cytoplasmic staining. In the ovary, PwSOX9 was found only in the cytoplasm of both cell types (Fig. 4).

Gonadal PwSOX9 Expression in Adults

In adults *P. waltl*, SOX9 was still expressed in the testis and the ovary (Fig. 5A). Since it has been reported in *X. tropicalis* that SOX9 expression in the ovary could be different between previtellogenic and vitellogenic oocytes, we performed a more detailed analysis of SOX9 expression in *P. waltl* oocytes. First, we studied SOX9 expression by western blot in folliculated oocytes. The protein was detected from stage I to stage VI with a detection profile identical at all stages (Fig. 5B). In stage VI oocytes, the

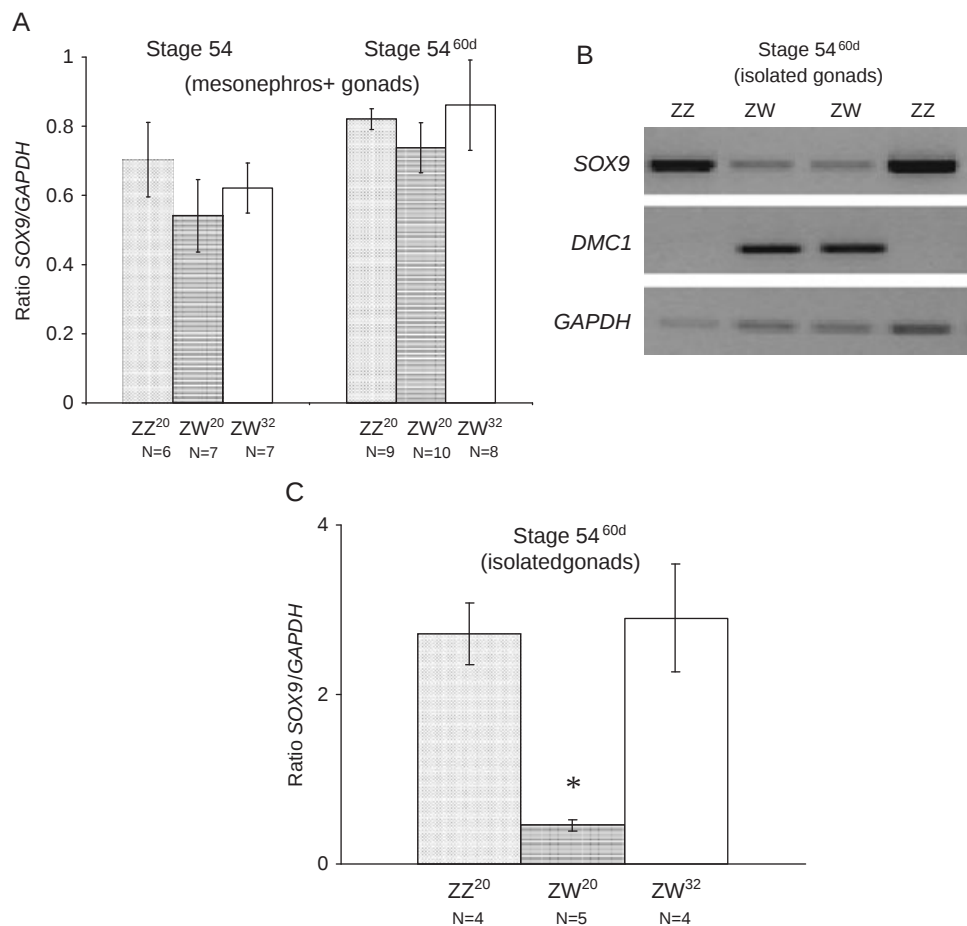


Figure 2. SOX9 expression in gonads and mesonephros during *Pleurodeles* larval development. (A) At stage 54 and 54^{60d}, i.e. during gonad differentiation, a 28 cycles RT-PCR was performed on gonad-mesonephros complexes of male or female larvae reared at 20°C (ZZ²⁰, ZW²⁰) or 32°C (ZW³²). The number of samples (N) is indicated. The relative intensities of SOX9 mRNAs were compared after normalization to GAPDH mRNA level. No significant difference was found in SOX9 mRNAs level between male and female gonad-mesonephros complexes. (B) Result of RT-PCR analyses performed at stage 54^{60d} on isolated gonads of two males (ZZ) and two females (ZW) larvae reared at 20°C. SOX9 is expressed at a higher level in the testes than in ovaries. The recombinase DMC1 is used as an indicator of ZW genotype (meiosis entry marker) and GAPDH as an internal control. (C) Results of quantitative real-time RT-PCR analyses performed at stage 54^{60d} on isolated gonads of male larvae reared at 20°C (ZZ²⁰) and female larvae reared at 20°C (ZW²⁰) or 32°C (ZW³²). The number of samples (N) is indicated. *Significantly different from control males ($P < 0.01$).

immunodetection profile was similar in folliculated and defolliculated oocytes showing that the staining could not be the result of the sole expression of SOX9 in follicle cells (Fig. 5C). In enucleated stage VI oocytes, SOX9 was still detected and band intensity was similar to those in nucleated oocytes. SOX9 could not be detected in stage VI oocyte nuclei (Fig. 5C).

In order to confirm the results of these biochemical studies, we also analyzed SOX9 localization on histological sections of adult ovaries but we could not use fluorescent secondary antibodies due to the intense autofluorescence of yolk platelets. Using biotinylated secondary antibodies and streptavidin-peroxidase,

we observed a perinuclear staining in previtellogenic oocytes (stage I) and a cortical staining in post-vitellogenic oocytes (stage VI) but we never observed a nuclear staining whatever the stage of oogenesis (Fig. 6). No staining was present in follicular cells. In comparison, a nuclear staining of both oocyte and follicular cells was observed when we used an anti-PCNA antibody as a control (Fig. 6).

DISCUSSION

In this study, we analyzed SOX9 expression at both the mRNA and protein levels during gonadogenesis and oogenesis in the

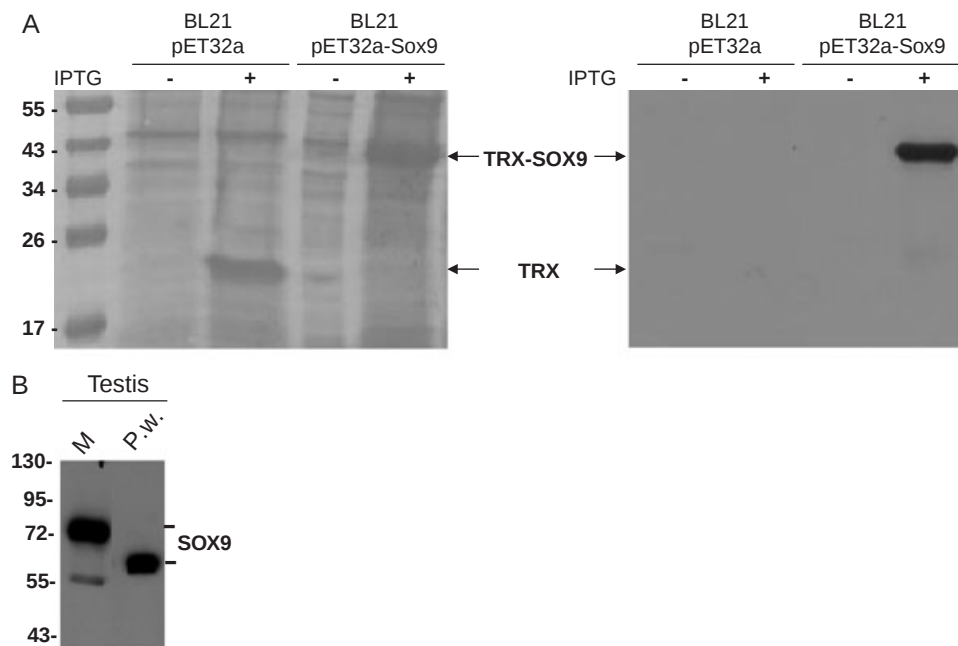


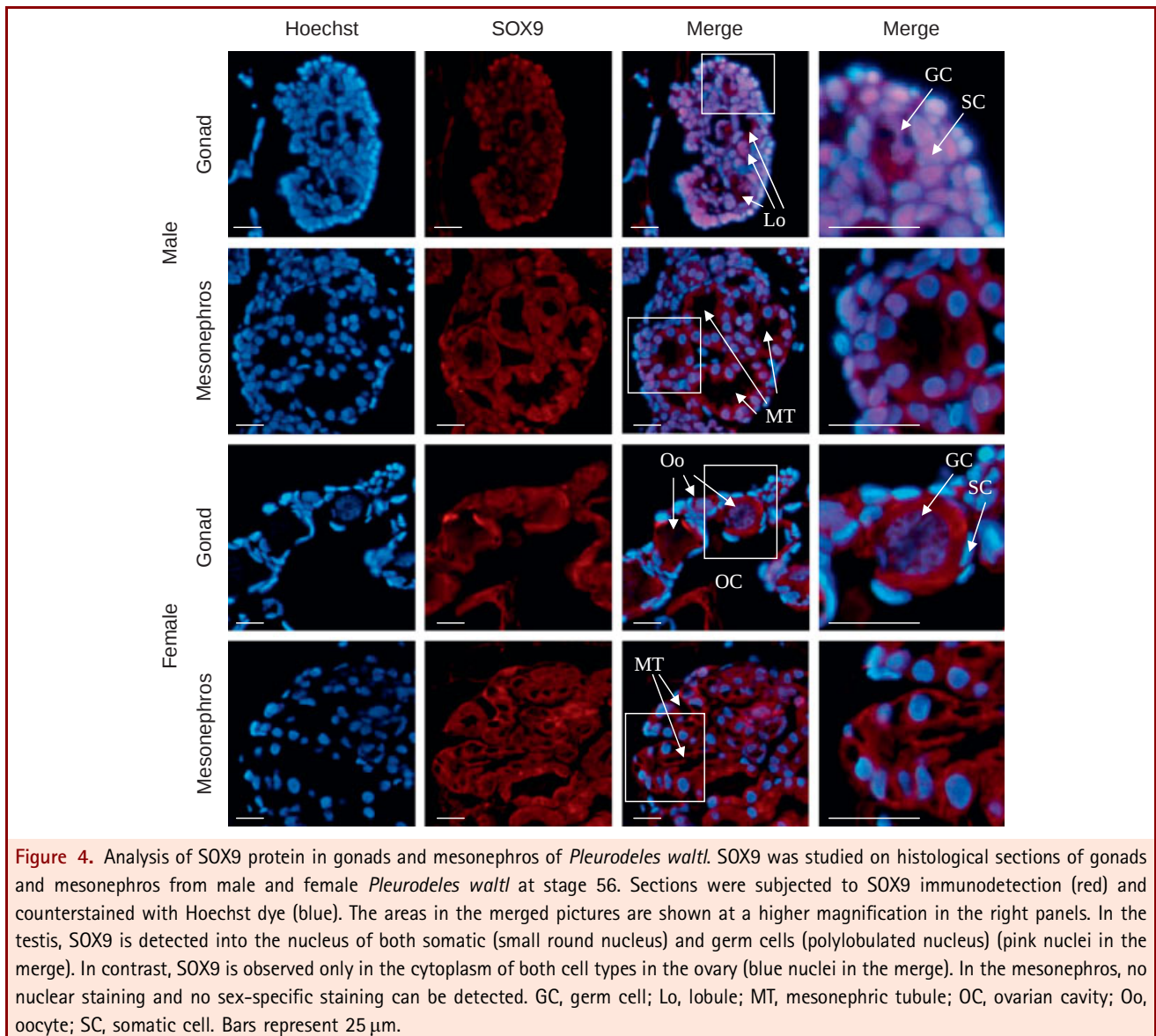
Figure 3. Recognition of *Pleurodeles waltl* SOX9 protein by the anti-human SOX9 antibody. (A) Western blot analysis of BL21 bacteria lysate supernatants. TRX and TRX-SOX9 expressions are induced in cultures grown in IPTG-containing medium as observed on the nitrocellulose membrane stained with Ponceau S (left panel). However, only the TRX-SOX9 fusion protein is detected after the incubation with the anti-human SOX9 polyclonal antibody (right panel). Molecular weight markers are indicated on the left (kDa). (B) Result of a western blot analysis of SOX9 protein detected with a polyclonal antibody raised against human SOX9 in a mouse embryo testis homogenate (M) (13.5 dpc) and a *P. waltl* (P.w.) testis-mesonephros homogenate (stage 54^{60d}). Molecular weight markers are indicated on the left (kDa).

urodele amphibian *P. waltl*. Up to now, the data about this major player of mammalian sex determination/differentiation are very poor in amphibian species and especially, *SOX9* has not been studied in caudate amphibian.

In *P. waltl*, we found only one *SOX9* mRNA isoform. This situation is similar to those described in anuran except for *R. rugosa* in which two mRNA isoforms have been isolated from the adult testis (Takase et al., 2000). In this species, *SOX9α* encodes a 482 AA protein containing the HMG box, whereas *SOX9β* lacks the HMG box and is a truncated form of *SOX9α* (265 AAs). PwSOX9 deduced AAs sequence indicated a putative protein of 479 AA with a HMG domain highly conserved among all vertebrates. Only two partial *SOX9* sequences were available for another caudate amphibian (*A. mexicanum*) that did not allow us to realize a highly efficient comparison. Our phylogenetic analysis revealed PwSOX9 to be more closely related to amniotes than anuran amphibians. However, the length of PwSOX9 was similar to those observed in anuran amphibians (*X. laevis* (477 AA), *B. gargarizans* and *B. bufo* (481 AA) and *B. marinus*, *X. tropicalis*, or *R. rugosa* (482 AA)). PwSOX9 was shorter than the sequences described in reptiles (*T. scripta* (492 AA), *C. palustris* (494 AA), or *A. mississippiensis* (495 AA)), in birds (*A. platyrhynchos* (489 AA), *G. gallus* (494 AA), or *C. japonica*

(495 AA)), or in mammals (*M. musculus* (507 AA) and *Homo sapiens*, or *Sus scrofa* (509 AA)). These differences in the length of *SOX9* proteins among vertebrates come from variation in the PQA-rich domain, which spans approximately 39–41 residues in mammals, 13–15 in birds, and 20–22 in reptiles. In anuran amphibians, the PQA-rich domain is shorter: 13 AA in *X. tropicalis* and *R. rugosa*, 8 AA in *X. laevis*. In PwSOX9, the PQA motif was replaced by a stretch of four Gln residues. The absence of the PQA motif was also described in fishes such as rainbow trout, medaka, or sturgeon (Takamatsu et al., '97; Yokoi et al., 2002; Hett et al., 2005). This PQA motif constitutes a transactivation domain required for *SOX9* maximal transcriptional activity and function (McDowall et al., '99). Thus, since PwSOX9 possesses only the PQS-rich C-terminal transactivation domain, its transcriptional activity could be lower than for other *SOX9*. In *C. palustris*, *SOX9* was recently shown to undergo extensive alternative splicing around and within the PQA-rich domain that results in variants with presumably reduced transactivation potential (Agrawal et al., 2009). The authors also observed this splicing in the mouse. Such a splicing event could not be observed in *P. waltl*.

We also studied PwSOX9 expression using an antiserum raised against the 62 N-terminal AA of human *SOX9*, which



showed 82% identity with the corresponding region of *P. waltl*. This antiserum was used recently to study SOX9 in *X. tropicalis* with an identity of 90% for the same N-terminal region (El Jamil et al., 2008). Our experiments using a bacterial protein expression system show that this antibody also cross-reacts with PwSOX9. On western blots, the anti-human SOX9 antibody revealed a band at 65 kDa in *P. waltl* gonad-mesonephros complexes, which is higher than the molecular mass predicted from the AAs sequence (52.7 kDa). This is in agreement with the fact that a higher apparent molecular mass is also found in mammals (68 vs. 56 kDa in the mouse) or in other vertebrates (60 vs. 54.3 kDa in *C. palustris*) (Murakami et al., 2000; Agrawal et al. 2009). Post-translational modifications like phosphorylations could be

responsible for these differences in the apparent molecular masses. Phosphorylation of SOX9 has been well described not only in chondrocytes but also in the Sertoli cell lineage (Huang et al., 2000; Malki et al., 2005).

In *P. waltl*, the first signs of gonad differentiation appear during larval life. Histology allows to discriminate between testis and ovary at stage 53 (germ cells are localized in testis medulla whereas they appear in ovarian cortex), whereas aromatase activity measurements allow to diagnose sex at stage 52 (aromatase activity begins to rise at this stage in female gonads) (Chardard et al., '95; Dumond et al., 2008a). In gonad-mesonephros complexes, SOX9 mRNAs were detected from stage 42, that is early before gonad differentiation. However, our

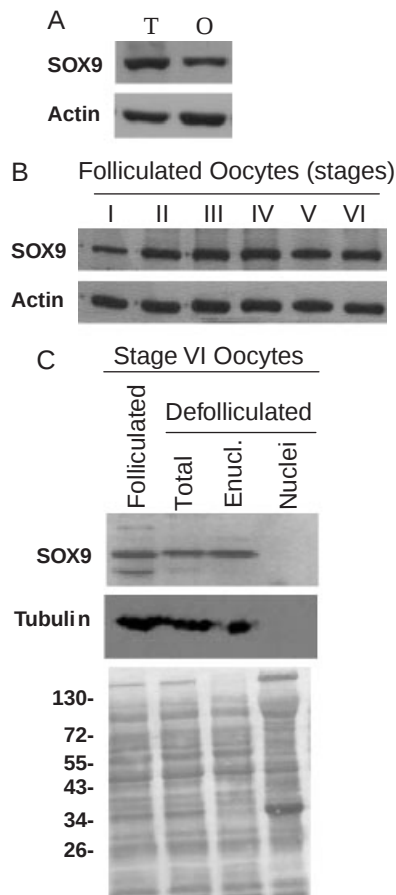


Figure 5. SOX9 expression in gonads of adult *Pleurodeles waltl*. (A) Western blot analysis of SOX9 in homogenates of testis (T) and ovary (O) from adult individuals. (B) Western blot analysis of SOX9 in homogenates of folliculated oocytes at the different stages of oogenesis. (C) A similar analysis performed on full-grown stage VI oocytes. SOX9 was detected in both folliculated and defolliculated oocytes. SOX9 intensity in the enucleated oocytes (enucl.) appeared equivalent than in the entire oocyte (Total), whereas no signal could be detected in the nuclei. Tubulin was used as a cytoplasm marker. The nitrocellulose membrane after Ponceau S staining is also shown, with molecular weight markers on the left (kDa).

semi-quantitative RT-PCR analyses revealed no difference in the amount of *SOX9* mRNA between gonad and mesonephros samples from ZZ and ZW larvae up to stage 54^{60d}. This was probably due to the expression of *SOX9* in the mesonephros, a phenomenon that was also reported in the mouse where it occurs in a non sex-dependent manner. Indeed, at stage 54^{60d}, at which gonad differentiation is already in progress, we could study *SOX9* mRNAs in isolated gonads. Our analyses indicated clearly that *SOX9* mRNAs were produced in both testes and ovaries and that a testis-enriched expression of *SOX9* mRNA occurred at this stage.

These findings are consistent with those performed in *R. rugosa*, since during tadpole development, both *SOX9* α and β isoforms were found not only in the testis but also in the ovary (Takase et al., 2000). In *X. laevis*, a similar situation was observed: in tadpoles, *SOX9* mRNA was detected in gonad-mesonephros complexes from stage 53 to 56 in both males and females (Osawa et al., 2005). In *B. marinus*, *SOX9* mRNA level was identical between ovary and testis at the time of metamorphosis considered as a presexual differentiation time point (Abramyan et al., 2009). In contrast to these species, in *X. tropicalis*, *SOX9* mRNA and protein were not detectable until metamorphosis in both sexes (El Jamil et al., 2008). The testis-enriched expression of *SOX9* that seems to occur at a late stage of gonad differentiation in *P. waltl* is also in accordance with the results obtained in some other amphibian species. Indeed, in *R. rugosa*, a testis-specific expression of *SOX9* mRNA appeared only 2 months after metamorphosis in juvenile animals (Takase et al., 2000). In *B. marinus*, a male-enriched expression was observed at the 20-mm stage at which gonad differentiation is already on the way (Abramyan et al., 2009).

In order for a transcription factor to regulate expression of target genes, it must be transported to the nuclei of cells. In the mouse, the lack of *SOX9* nuclear translocation induced a sex reversal phenotype in male gonads showing that *SOX9* must be nuclear for the male sex determination process (Smith and Koopman, 2004). Immunofluorescence experiments using a specific anti-*SOX9* antibody allowed us to study the subcellular localization of *SOX9* on histological sections of *P. waltl* gonad-mesonephros complexes: a nuclear localization of *SOX9* was observed only in the testis. This was observed at the end of metamorphosis (stage 56). When ZZ gonads were examined at previous developmental stages or later in juveniles, *SOX9* was detected in the cytoplasm (not shown) suggesting that the localization of *SOX9* into the nucleus corresponds to a particular, but not precisely determined step in the course of the male gonad differentiation. The prostaglandin D2-induced phosphorylation by PKA of serine 64 and serine 181 has been shown to be important for the nuclear translocation of *SOX9* in mouse Sertoli cells (Malki et al., 2005). In PwSOX9, only one of these serines is conserved (Asn 65, Ser 182). In the mouse, this serine (Ser 181), located within the second NLS in the HMG box is indeed essential for the *SOX9* protein interaction with importin beta (Malki et al., 2005).

In adults, *SOX9* was expressed both in testes and ovaries. We studied in detail the expression of *SOX9* in the ovary. In the mouse, *SOX9* was absent from immature ovary but it was transiently expressed in mature ovary depending on the follicular cycle (Notarnicola et al., 2006). A nuclear localization of *SOX9* was observed only in the inner cells of the theca interna cell layer surrounding pre-antral/antral follicles (Notarnicola et al., 2006). In zebrafish, on the other hand, *SOX9b* mRNA was found to be expressed in the cytoplasm of oocytes from adult ovaries but not in other ovarian cell types (Chiang et al., 2001; Rodríguez-Mari

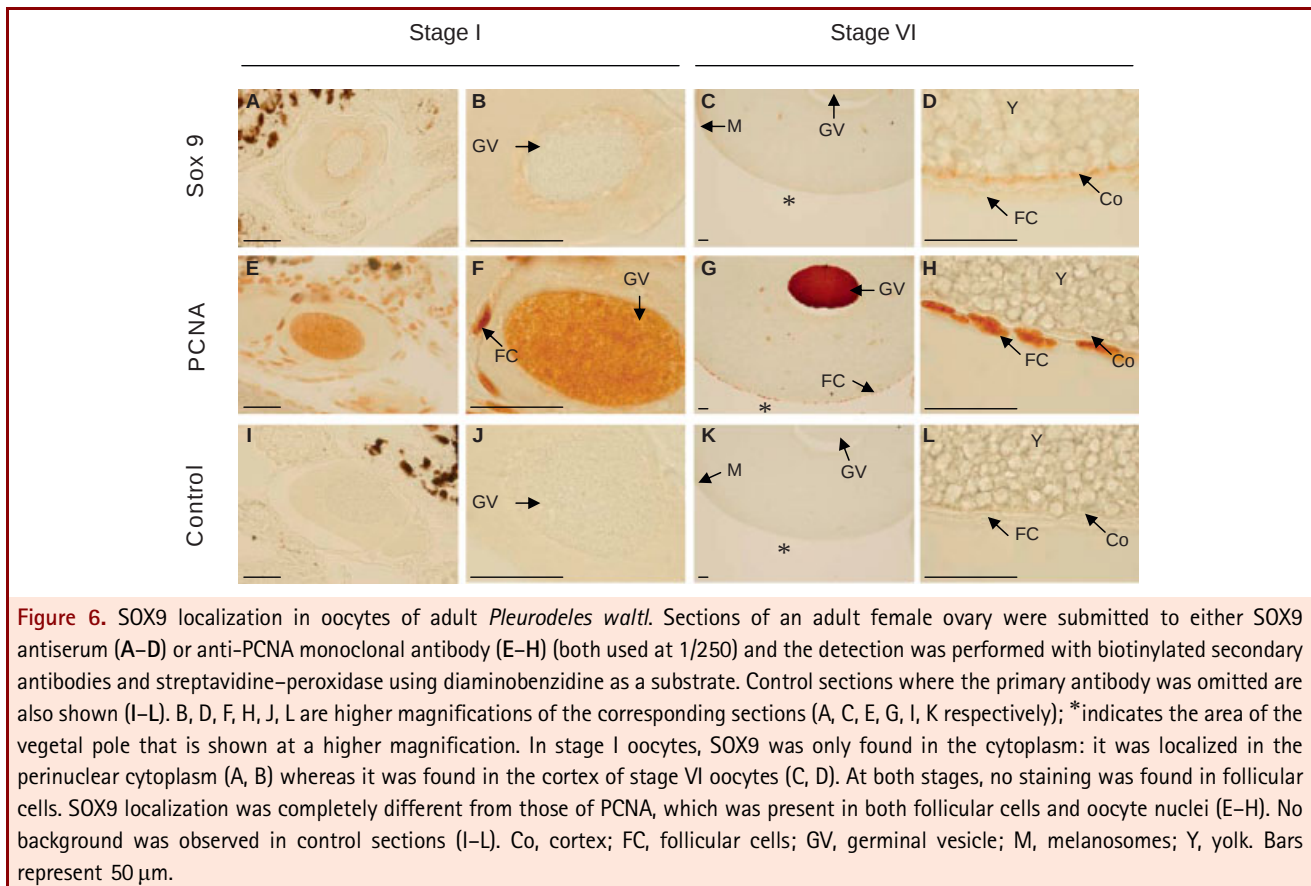


Figure 6. SOX9 localization in oocytes of adult *Pleurodeles waltl*. Sections of an adult female ovary were submitted to either SOX9 antiserum (A–D) or anti-PCNA monoclonal antibody (E–H) (both used at 1/250) and the detection was performed with biotinylated secondary antibodies and streptavidine–peroxidase using diaminobenzidine as a substrate. Control sections where the primary antibody was omitted are also shown (I–L). B, D, F, H, J, L are higher magnifications of the corresponding sections (A, C, E, G, I, K respectively); * indicates the area of the vegetal pole that is shown at a higher magnification. In stage I oocytes, SOX9 was only found in the cytoplasm: it was localized in the perinuclear cytoplasm (A, B) whereas it was found in the cortex of stage VI oocytes (C, D). At both stages, no staining was found in follicular cells. SOX9 localization was completely different from those of PCNA, which was present in both follicular cells and oocyte nuclei (E–H). No background was observed in control sections (I–L). Co, cortex; FC, follicular cells; GV, germinal vesicle; M, melanosomes; Y, yolk. Bars represent 50 μ m.

et al., 2005). In the medaka, SOX9 was also expressed in the previtellogenic oocyte (Yokoi et al., 2002). Among amphibians, the expression of SOX9 in the female gonad appears to vary according to species. In *R. rugosa* the testis-specific expression of SOX9 appeared only in juvenile animals 2 months after metamorphosis and the adult ovary did not produce SOX9 (Takase et al., 2000). In *X. laevis*, no expression was found in the ovary (Osawa et al., 2005). In *X. tropicalis* ovary, in contrast to what is described in other vertebrates, SOX9 mRNA and protein were found in germ cells: the localization was cytoplasmic in previtellogenic oocytes and nuclear in vitellogenic oocytes (El Jamil et al., 2008). In *B. marinus*, a cytoplasmic expression of SOX9 was also observed in previtellogenic oocytes (Abramyan et al., 2009). In adult *P. waltl* ovary, SOX9 was found in oocytes at all stages of vitellogenesis. The presence of SOX9 in folliculated oocytes was the result of oocyte's expression rather than those of follicular cells, that is consistent with the germ cell-specific expression reported in the adult ovary of *X. tropicalis* and *B. marinus*. Our analyses of cytoplasmic (enucleated oocytes) and nuclear fractions, as well as our studies of SOX9 immunolocalization on ovary sections revealed that even in the full-grown stage VI oocytes, the localization was cytoplasmic.

During oogenesis, SOX9 changed from a perinuclear localization in stage I oocytes (previtellogenic) to a cortical localization in stage VI oocytes (post-vitellogenic). This result could suggest that in *P. waltl* oocytes, SOX9 is not produced to regulate transcription. It could act as a partner for an unknown protein but this has to be clarified.

To conclude, our study describes for the first time SOX9 in a caudate amphibian. Like in anuran amphibians and other non mammalian vertebrates, SOX9 is expressed differentially in the developing gonads only at a late stage and is probably involved in gonad structural differentiation rather than sex determination. Its expression in oocytes is not restricted to anurans like *B. marinus* or *X. tropicalis* and could be a more general feature of anamniotes. However, due to the absence of nuclear localization in these cells the role played by SOX9 in oocytes has still to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Martine Chillet for her excellent work in histology, Alexandra Kleinclauss and Elia Bouvry for technical assistance and animal rearing. We also thank Nicolas Rouhier for his help and advices regarding SOX9 protein expression. This study was

supported by grants of the “Université Henri Poincaré” (BQR), of the “Ligue contre le Cancer”, of the “Association pour la Recherche sur le Cancer” and of the FEDER. Imane Al-Asaad was recipient of a Syrian government fellowship (decision 1033).

LITERATURE CITED

- Abramyan J, Feng CW, Koopman P. 2009. Cloning and expression of candidate sexual development genes in the cane toad (*Bufo marinus*). *Dev Dyn* 238:2430–2441.
- Agrawal R, Wessely O, Anand A, Singh L, Aggarwal RK. 2009. Male-specific expression of Sox9 during gonad development of crocodile and mouse is mediated by alternative splicing of its proline-glutamine-alanine rich domain. *FEBS J* 276:4184–4196.
- Barriónuevo F, Naumann A, Bagheri-Fam S, Speth V, Taketo MM, Scherer G, Neubüser A. 2008. Sox9 is required for invagination of the otic placode in mice. *Dev Biol* 17:213–224.
- Bonnafant-Jais ML, Mentré P. 1983. Study of oogenesis in the newt *Pleurodeles waltlii* M. I. Ultrastructural study of the different stages of oocyte development. *J Submicrosc Cytol* 15:453–478.
- Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dournon C. 1995. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltli* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen Comp Endocrinol* 99:100–107.
- Chiang EF, Pai CI, Wyatt M, Yan YL, Postlethwait J, Chung B. 2001. Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol* 231:149–163.
- De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P. 1998. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18:6653–6665.
- De Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Berta P. 2000. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn* 217:293–298.
- Dournon C, Houillon C. 1985. Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. *Reprod Nutr Dev* 24:671–688.
- Dumond H, Kuntz S, Chesnel A, Ko CI, Wallacides A, Chardard D, Flament S. 2008a. Sexual development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltli*. *Sex Dev* 2:104–114.
- Dumond H, Maufroid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A, Flament S. 2008b. Freemartin in the amphibian *Pleurodeles waltli*: parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. *Mol Reprod Dev* 75:439–449.
- El Jamil A, Kanoush R, Magre S, Boizet-Bonhoure B, Penrad-Mobayed M. 2008. Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn* 237:2996–3005.
- Gallien L, Durocher M. 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltli*. *Bull Biol Fr Belg* 91:97–114.
- Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, Boizet-Bonhoure B. 2002. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11199–11204.
- Hett AK, Pitra C, Jenneckens I, Ludwig A. 2005. Characterization of Sox9 in European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *J Hered* 96:150–154.
- Hong CS, Saint-Jeannet JP. 2005. Sox proteins and neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 16:694–703.
- Huang W, Zhou X, Lefebvre V, de Crombrughe B. 2000. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* 20:4149–4158.
- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B. 2006. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 4:e187.
- Klüver N, Kondo M, Herpin A, Mitani H, Schartl M. 2005. Divergent expression patterns of Sox9 duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. *Dev Genes Evol* 215:297–305.
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G, Nagahama Y. 2008. Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9a during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev Dyn* 237:297–306.
- Koopman P, Schepers G, Brenner S, Venkatesh B. 2004. Origin and diversity of the SOX transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes*. *Gene* 328:177–186.
- Kuntz S, Chesnel A, Duterque-Coquillaud M, Grillier-Vuissoz I, Callier M, Dournon C, Flament S, Chardard D. 2003. Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltli*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:89–100.
- Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Méjean C, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B. 2005. Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J* 24:1798–1809.
- McDowall S, Argentaro A, Ranganathan S, Weller P, Mertin S, Mansour S, Tolmie J, Harley V. 1999. Functional and structural studies of wild type SOX9 and mutations causing campomelic dysplasia. *J Biol Chem* 274:24023–24030.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14:62–68.
- Moreno-Mendoza N, Harley VR, Merchant-Larios H. 1999. Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 284:705–710.
- Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B. 2000. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1113–1118.

- Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N. 2005. Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*. 333: 729–736.
- Notarnicola C, Malki S, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B. 2006. Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene Expr Patterns* 6:695–702.
- Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D, Magre S. 1998. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn* 212:522–532.
- Osawa N, Oshima Y, Nakamura M. 2005. Molecular cloning of Dmrt1 and its expression in the gonad of *Xenopus*. *Zoolog Sci* 22: 681–687.
- Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D. 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391:691–695.
- Rodríguez-Marí A, Yan YL, Bremiller RA, Wilson C, Cañestro C, Postlethwait JH. 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (Amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Expr Patterns* 5: 655–667.
- Shoemaker CM, Queen J, Crews D. 2007. Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Mol Endocrinol* 21:2750–2763.
- Sim H, Argentaro A, Harley VR. 2008. Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. *Trends Endocrinol Metab* 19:213–222.
- Smith JM, Koopman PA. 2004. The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease. *Trends Genet* 20:4–8.
- Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y, Mano H. 2006. Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes. *Gen Comp Endocrinol* 145:208–213.
- Takamatsu N, Kanda H, Ito M, Yamashita A, Yamashita S, Shiba T. 1997. Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene* 202:167–170.
- Takase M, Noguchi S, Nakamura M. 2000. Two Sox9 messenger RNA isoforms: isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa*. *FEBS Lett* 466:249–254.
- Thomsen MK, Francis JC, Swain A. 2008. The role of Sox9 in prostate development. *Differentiation* 76:728–735.
- Vaillant S, Magre S, Dorizzi M, Pieau C, Richard-Mercier N. 2001. Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Dev Dyn* 222:228–237.
- Valleley EM, Cartwright EJ, Croft NJ, Markham AF, Coletta PL. 2001. Characterisation and expression of Sox9 in the Leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 291:85–91.
- Western PS, Harry JL, Graves JA, Sinclair AH. 1999a. Temperature-dependent sex determination: upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Dev Dyn* 214:171–177.
- Western PS, Harry JL, Graves JA, Sinclair AH. 1999b. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn* 216:411–419.
- Western PS, Harry JL, Marshall Graves JA, Sinclair AH. 2000. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* 241:223–232.
- Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, Nagahama Y, Wakamatsu Y, Takeda H, Araki K, Morohashi K, Ozato K. 2002. Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Mol Reprod Dev* 63:5–16.
- Zhou R, Liu L, Guo Y, Yu H, Cheng H, Huang X, Tiersch TR, Berta P. 2003. Similar gene structure of two Sox9a genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*). *Mol Reprod Dev* 66:211–217.

I.2) Etude de l'expression de l'Amh au cours de la différenciation sexuelle chez l'amphibien *Pleurodeles waltl*

I.2.1) Introduction

Chez la plupart des vertébrés, lorsque les gonades sont encore indifférenciées, les ébauches du canal de Wolff et du canal de Müller sont toutes les deux présentes. Au moment de la différenciation gonadique, chez le mâle, en plus de la testostérone qui induit la différenciation des canaux de Wolff en spermiductes, les testicules produisent également l'AMH qui induit la régression des canaux de Müller (Jost, 1947). Chez les femelles, en l'absence de l'AMH, les canaux de Müller sont maintenus et se différencieront en oviductes sous l'influence des œstrogènes ovariens. Il faut toutefois signaler quelques situations particulières : celle de nombreux poissons où il n'existe pas de canal de Müller, l'oviducte étant un prolongement de la gonade, et celle de poissons comme l'esturgeon ainsi que les amphibiens urodèles où les mâles adultes conservent les canaux de Müller indifférenciés. Le devenir des canaux de Wolff varie : chez les anamniotes, il est maintenu chez les femelles car en absence de métanéphros et d'uretère secondaire, il servira d'uroducte, tandis que chez les amniotes il régresse, l'urine produite par le métanéphros étant éliminée par l'uretère secondaire.

L'AMH est un membre de la famille du TGF- β . C'est une glycoprotéine homodimérique reliée par des ponts disulfures et synthétisée sous forme d'un précurseur relativement long, qui nécessite un clivage protéolytique près de l'extrémité C-terminale pour acquérir une activité biologique. Comme tous les membres de la famille du TGF- β , l'AMH est sécrétée et transduit son signal par l'intermédiaire de deux récepteurs membranaires à activité sérine/thréonine kinase. Une fois l'AMH fixée à son récepteur de type II, ce complexe recrute et phosphoryle un récepteur de type I qui à son tour active des protéines cytoplasmiques, les Smads. Ces dernières se lient à un partenaire commun, Smad 4, permettant la translocation nucléaire et stimulant donc, en collaboration avec les co-activateurs, la transcription de gènes cibles (Josso *et al.*, 2001).

L'invalidation du gène de l'*Amh* chez des souris mâles conduit au développement de pseudo-hermaphrodites avec rétention des canaux de Müller (Behringer *et al.*, 1994). Il en est de même pour la mutation du récepteur de type II chez la souris (Mishina *et al.*, 1996). Au contraire, la surexpression de l'*Amh* chez des souris femelles entraîne la régression des canaux de Müller (Behringer *et al.*, 1990). Chez l'homme, les mutations affectant l'AMH ou

DIR-1 → gctttgtttctatttggtcaagaagaatca gcgagaaggagaacagaccatcaatttct ttgcctcagaatgatggagaggaccatgat 90
 A L F L L V K K K S A Q K E N R P S I S L P Q N D G E D H D 30
 → gttgtgtctgatcctgaactcaggcagaat cctgaattcaaaaaagaagtacagaaact ccgaatcaaggcgagtaccctcctttggaa 180
 V V S D P E L R Q N P E F K K E V T E T P N Q G E Y P P L E 60
 ← AMHq-rev2
 cacactgatgtcttcttggagattcttgca aagtttgttgaaaagggtgctaagcagtttc aaagagcagaccgagacattgggtgcttcct 270
 H T D V F L E I L A K F V G K V L S S F K E Q T E T L V L P 90
 atagatccgacaaccagactttggagacc ttcgcttccaatccactcaatgtctcggaa aaggcggtcattgagtggtggtggaatcg 360
 I E S D N Q T L E T F A S N P L N V S E K A V I E W L V E S 120
 → AMH-1
 gaggagcccctggtgttctgttcccgaagaa agaagccagaccttgctagagcgccacttt gtacagggaagctggaggggaaacttctg 450
 E E P L V F L F P K R S Q T L L E R H F V Q G K L E G K L L 150
 gagaagttgatggagaagctccacactgtg ttagaagagttgtgaaactcccagtaatc agggacaatgccggacttctcaaacacatc 540
 E K L M E K L H T V L E E L L K L P V I R D N A G L L K H I 180
 ← AMH-3
 ctggaccactgctatggctccttcgattta ggtagcttaccaggaccagcagccacgatg cacaagagagcagccacggccataagaag 630
 L D H C Y G S F D L G S L P G P R A T M H K E S S H G H K K 210
 ctgcactcgtggtgatgctgaaggccatg cagaccgtgagagcgtagtgagagaagg accacgctgtcgcgacagaaccggagcact 720
 L H S L V M L K A M Q T V R A Y W Q K R T T L S R Q N R S T 240
 ← AMH-2
 ggcagcaagacctactgccggctccaggag ctcaccatgaaactgcgattcgcgacagag aacagcaacattgtcctccctaccaagtat 810
 G S K T Y C R L Q E L T M K L R F E H E N S N I V L P T K Y 270
 gtgcctacaactgcgagggaccgtgcgtg ctgccacagcacacgctgagcgagaccaac aaccacgtcatcttgctcatcaagatgagg 900
 V A Y N C E G P C V L P Q H T L S E T N N H V I L L I K M R 300
 gacagtgggtgcaacactggggcgcgccca tgctgcgtgccagagaagtacggcaagctg aatgttgggacgtgactgaggacggcctg 990
 D S G A T L G R G P C C V P E K Y G K L N V G T L T E D G L 330
 ← REV
 ctcttcaggccatacccc 1008
 L F R P Y P 336

Figure 55 : Séquence de l'ADNc de l'*amh* du pleurodèle. Les amorces utilisées pour l'étude sont indiquées.

son récepteur conduisent au syndrome de persistance des canaux de Müller, PMDS, où les canaux de Müller sont conservés chez les individus XY (Belville *et al.*, 1999; di Clemente & Belville, 2006).

Chez les bovins mâles, l'AMH est détectable pendant la différenciation des tubules séminifères avec un pic au moment de la régression des canaux de Müller. Ce niveau d'expression est stable jusqu'à la naissance, puis il diminue (Vigier *et al.*, 1983). Les résultats sont similaires chez la souris, l'homme, le poulet et l'alligator (Morrish & Sinclair, 2002).

Chez la plupart des poissons téléostéens, l'Amh et son récepteur sont exprimés chez les mâles malgré l'absence de canaux de Müller. En plus, chez le medaka, cette hormone contrôle la prolifération des CG car une mutation dans le gène codant l'*amhr-II* inhibe la fixation de l'Amh sur son récepteur et conduit à des gonades hypertrophiées dans les deux sexes, résultant de la prolifération excessive des CG (Morinaga *et al.*, 2007; Shiraishi *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2012a).

À ce jour, l'AMH n'a jamais été décrite chez les amphibiens et son existence chez les urodèles est discutable puisque chez les mâles, les canaux de Müller sont maintenus.

I.2.2) Principaux résultats

L'isolement d'un ADNc partiel de l'*amh* a été réalisé en plusieurs étapes chez *Pleurodeles waltl* à partir d'ADNc de testicule juvénile (GenBank JX987526). Un premier fragment de 470 pb, situé au milieu de la région C-terminale a été obtenu par PCR dégénérée. Ensuite, en utilisant deux amorces spécifiques de *Pwamh* et deux amorces dégénérées, nous avons amplifié deux fragments de 732 pb et 636 pb en 5' et 3' respectivement. Au total, nous disposons d'une séquence de 1008 pb correspondant à une partie de la région N-terminale et à la majorité de la région C-terminale portant l'activité biologique de la protéine. Afin d'obtenir la séquence entière de l'*amh*, de nombreuses tentatives ont été réalisées en utilisant la technique de RACE-PCR ainsi qu'une PCR avec une amorce oligo-dT et une autre spécifique de *Pwamh* mais elles n'ont pas permis de compléter la séquence.

La protéine déduite comporte 336 acides aminés et montre une conservation relativement faible au sein des vertébrés : de 34% avec le poulet à seulement 16% avec le medaka. Cependant, la similarité est plus élevée au niveau de la partie C-terminale : de 44% avec le poulet et l'ornithorynque à 20% avec le medaka. En plus, cette séquence présente 5 des 7 résidus cystéines conservés entre les vertébrés, caractéristiques du domaine TGF- β . L'arbre

Nom	Séquence
DIR-1	5'-GACCATGATGTTGTGTCTGA-3'
REV	5'-TCCAAGAAGACATCAGTGTG-3'
AMH1	5'-CTCATCATCAGCAAATCATCAGC-3'
AMH2	5'-ATTCCATTTTCATTCATGCCAAC-3'
AMH3	5'-GAAGGTAGTAAGCAACGCCTCCT-3'
AMH4	5'-CACAGCATGTACAGTGGTCATCA-3'
AMH5	5'-CAGCGCAGAAGGAGAACAGA-3'
AMHq-dir2	5'-TCCACCAGCCACTCAATGAC-3'
AMHq-rev2	5'-GCAGTCTCATACACTGTGCGTTAC-3'

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour l'étude de l'Amh.

phylogénétique de séquences d'AMH de différents vertébrés montre que la séquence isolée chez le pleurodèle ségrège avec l'AMH d'autres vertébrés et qu'elle est clairement séparée des autres membres de la famille du TGF- β . Toutes les amorces utilisées pendant cette étude ont été définies et répertoriées sur la séquence obtenue (Figure 55, Tableau 6).

Des études d'expression ont été menées dans les gonades en développement. Nous avons effectué des analyses par PCR en temps réel, et nous avons constaté un niveau des transcrits *amh* significativement plus élevé chez les mâles que chez les femelles dans le complexe GM aux stades 50 et 54 et dans les gonades isolées au stade 54+60j : 1,7x, 3,6x et 12,5x respectivement. Après la métamorphose, le taux d'ARNm d'*amh* diminue dans les testicules dont le niveau d'expression est similaire à celui observé dans l'ovaire.

Pour déterminer le type cellulaire exprimant l'*amh*, la technique d'HIS a été choisie. Pour cela, nous avons fixé des testicules juvéniles dans le paraformaldéhyde 4% et nous avons réalisé des coupes à congélation. Ensuite, les échantillons ont été hybridés durant une nuit à 70°C en rajoutant les sondes ARN marquées à la digoxigénine (11-DIG-UTP, Roche) préparées au laboratoire, à la concentration de 2ng/ μ l. L'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (anti-DIG-AP Fab fragment, Roche) a été dilué 5000 fois dans du tampon TBS contenant de la BSA (0,5%) et appliqué pendant une nuit sur les échantillons. Le lendemain, plusieurs lavages au TBST (TBS+0,1% Tween20) ont été effectués. Finalement le marquage a été révélé en appliquant du BMP (BM purple, Roche) pendant une nuit. Un signal *amh* a été détecté dans les lobules testiculaires, là où se trouvent les cellules équivalentes aux cellules de Sertoli et les CG. En comparant les marquages obtenus avec les sondes sens et antisens, il s'avère que ce sont les cellules somatiques qui expriment l'*amh* (Figure 56).

Des études ont aussi porté sur des animaux adultes. En analysant par RT-PCR les messagers *amh* dans des échantillons de différents tissus, ceux-ci n'ont été détectés que dans les gonades : le testicule et l'ovaire. Une étude par western blot a aussi été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'AMH bovine (Mab 168) généreusement fourni par le docteur N. di Clemente (INSERM, Clamart). Cet anticorps a révélé une bande correspondant à une protéine de 72 kDa, ce qui est similaire à l'AMH bovine. Le signal était fort dans le testicule et plus faible dans l'ovaire. Afin de déterminer si la protéine Amh pouvait être sécrétée dans le testicule de pleurodèle, nous avons effectué des cultures organotypiques et des analyses western blot. L'anticorps monoclonal a détecté également une protéine de 72 kDa dans le milieu de culture conditionné par des testicules adultes de pleurodèle mais ni dans le milieu de culture

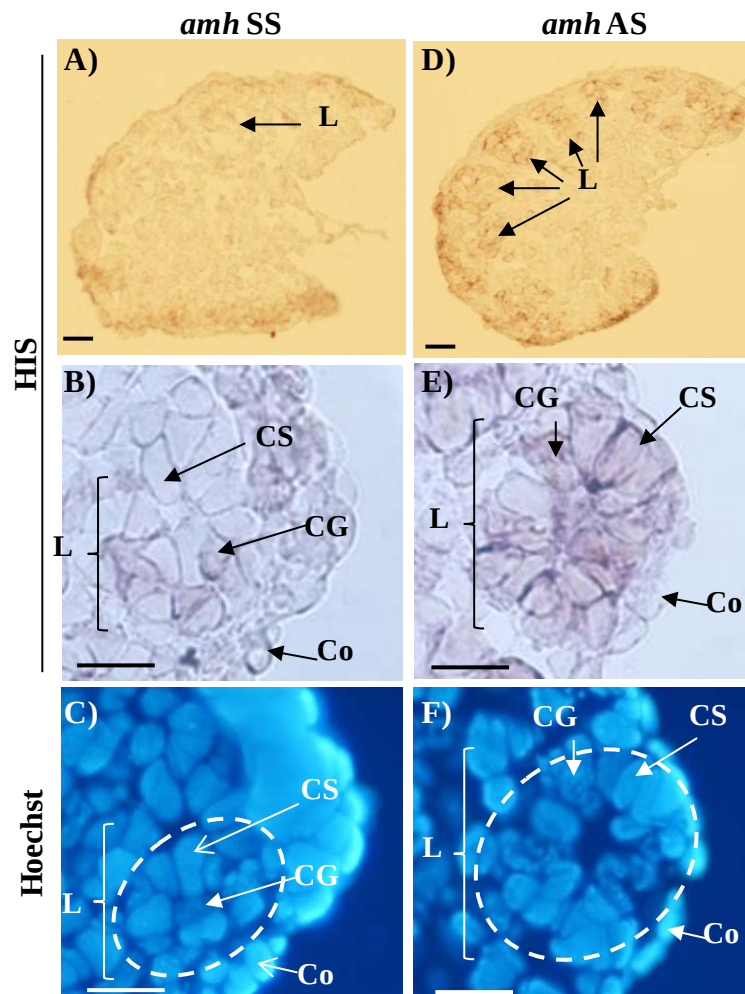


Figure 56 : Hybridation *in situ* montrant l'expression de l'*amh* dans la gonade mâle juvénile du pleurodèle. A-B) Résultats obtenus avec la sonde sens (SS) C) Coupe correspondant à la même région qu'en B, colorée au Hoechst D-E) Résultats obtenus avec la sonde anti-sens (AS) F) Coupe correspondant à la même région qu'en E, colorée au Hoechst. La sonde sens (SS) montre un marquage aspécifique dans les cellules germinales (CG) tandis que les cellules somatiques (CS) ne sont pas marquées. La sonde anti-sens (AS) marque les lobules testiculaires (L) et au sein des lobules, les cellules de Sertoli sont marquées. Cortex (Co). Bars = 50 μ m.

conditionné par le foie ni dans le milieu non conditionné. Cela suggère que l'Amh de pleurodèle pourrait être traduite et sécrétée par le testicule.

Nous avons aussi étudié l'expression de l'*amh* dans des situations d'inversions sexuelles. En ce qui concerne l'effet masculinisant de la température, des larves génétiquement femelles (ZW) ont été élevées à 32°C à partir du stade 42 (début de la période thermosensible). Les analyses des gonades au stade 54+60j par PCR en temps réel ont révélé une augmentation de 3,6 fois du taux d'ARNm de l'*amh* chez ces larves (ZW³²) par rapport aux larves témoins élevées à 20°C (ZW²⁰). Afin de vérifier l'effet masculinisant de la température, nous avons aussi étudié l'expression de l'*aromatase*, l'enzyme synthétisant des œstrogènes : nous avons constaté une diminution de 7,7 fois de chez les larves ZW³² par rapport aux témoins ZW²⁰. Nous avons également étudié *dmc1*, recombinaison marqueur de l'entrée en méiose qui se produit au stade 54+2mois chez les larves ZW mais post-métamorphose chez les larves ZZ. L'expression de *dmc1* n'est pas détectée dans les larves ZW³², ce qui est aussi en accord avec l'effet masculinisant de la température.

Nous avons enfin étudié des larves ZZ traitées par l'E₂. L'expression de l'*amh* a été inhibée lors d'un traitement à l'E₂ à 100 µg/L, alors qu'elle n'est pas modifiée chez les traitées par E₂ à 1 µg/L. Cette inhibition était en accord avec le fait que seule la dose la plus élevée d'E₂ soit féminisante. En effet, l'augmentation de l'expression de l'*aromatase* et l'expression de *Dmc1* ne s'observent qu'en réponse à la forte dose de l'E₂.

I.2.3) Conclusion

Nous avons montré pour la première fois la présence de l'Amh chez un amphibien. Bien que la séquence isolée soit incomplète et que les données au niveau protéique pourraient être confortées grâce à l'obtention d'un anticorps dirigé contre la protéine de pleurodèle, nos travaux montrent une expression majoritaire dans le testicule lors de la différenciation gonadique et les analyses d'inversions sexuelles indiquent que c'est un bon marqueur de la différenciation testiculaire.

En complément des résultats obtenus chez le poisson medaka qui ne possède pas de canaux de Müller, la découverte de l'Amh chez un amphibien dont les mâles conservent ces canaux suggère que le rôle de l'Amh dans la régression des canaux de Müller est apparu secondairement au cours de l'évolution et que son rôle primitif avait à voir avec la différenciation gonadique, et peut-être avec le contrôle de la prolifération des CG.

Article 2.

Müllerian Inhibiting Substance in the Caudate Amphibian *Pleurodeles waltl*

Imane Al-Asaad, Dominique Chardard, Nathalie di Clemente, Jean-Yves Picard, Hélène Dumond, Amand Chesnel, and Stéphane Flament

Centre National de la Recherche Scientifique (I.A.-A., H.D., A.C., S.F.), CRAN, Unité Mixte de Recherche (UMR) 7039, and Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (D.C.), Equipe d'Accueil 3998, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France; and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 782 (N.d.C., J.-Y.P.) and Université Paris-Sud, UMR-S0782, Clamart, F-92140, France

Müllerian inhibiting substance (MIS, also known as anti-Müllerian hormone), is a key factor of male sex differentiation in vertebrates. In amniotes, it is responsible for Müllerian duct regression in male embryos. In fish, despite the absence of Müllerian ducts, MIS is produced and controls germ cell proliferation during gonad differentiation. Here we show for the first time the presence of MIS in an amphibian species, *Pleurodeles waltl*. This is very astonishing because in caudate amphibians, Müllerian ducts do not regress in males. Phylogenetic analysis of MIS *P. waltl* ortholog revealed that the deduced protein segregates with MIS from other vertebrates and is clearly separated from other TGF- β family members. In larvae, MIS mRNA was expressed at higher levels in the developing testes than in the ovaries. In the testis, MIS mRNA expression was located within the lobules that contain Sertoli cells. Besides, expression of MIS was modified in the case of sex reversal: it increased after masculinizing heat treatment and decreased after estradiol feminizing exposure. In addition to the data obtained recently in the fish medaka, our results suggest that the role of MIS on Müllerian ducts occurred secondarily during the course of evolution. (*Endocrinology* 154: 3931–3936, 2013)

In most vertebrate species, male and female reproductive tracts, the Wolffian and Müllerian ducts, respectively, are both present in the embryo before gonad differentiation. In males, in addition to testosterone that allows the Wolffian ducts to persist and to differentiate as spermi-ducts and accessory organs, the differentiating testes also produce Müllerian inhibiting substance (MIS) that induces Müllerian duct regression (1). In female embryos, in the absence of MIS, Müllerian ducts are maintained and will differentiate into oviducts under the influence of ovarian estrogens.

MIS is a member of the TGF- β family (2). This homodimeric disulfide-linked glycoprotein must be cleaved at a proteolytic site to release the C-terminal domain, in which resides the biological activity. Like TGF- β , MIS signals through 2 distinct serine/threonine receptors: MIS

binding induces the assembly of a receptor complex in which the type II receptor phosphorylates and activates the type I receptor. Once activated, the type I receptor activates cytoplasmic proteins, the Smads, which bind to a common partner, Smad 4, allowing nuclear translocation, and together with coactivators, stimulate the transcription of target genes (3). In humans, in cases of mutations affecting MIS or its receptor, Müllerian ducts are retained in males, a condition known as the persistent Müllerian duct syndrome (4–7).

MIS has been found in reptiles, birds, and mammals (8). In teleost fishes, MIS and its receptor are expressed in males despite the absence of Müllerian ducts, and the hormone controls germ cell proliferation (9–11). To date, MIS has never been described in Amphibia, and its existence in the Caudata is questionable because in this order, Müllerian ducts are maintained in adult males.

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

Received March 10, 2013. Accepted July 22, 2013.

First Published Online September 9, 2013

Abbreviations: DMC1, disrupted meiotic cDNA 1; E₂, estradiol; MIS, Müllerian inhibiting substance.

Pleurodeles waltl, the Iberian ribbed newt (Figure 1), is a member of the Salamandridae family. It is a gonochoristic species with genetic sex determination; males are determined by the monogametic ZZ genotype, whereas females display a heterogametic ZW genotype (12). At stage 53, the early differentiation of the gonadal sex can be detected histologically. In ZW larvae, oogonia stay in the cortex where they proliferate. At stage 54, these cells associate with somatic cells and constitute follicles. Most of the oogonia enter meiosis, and this process is arrested at prophase I. The ovary differentiates as an ovisac because medulla regression leaves a cavity (Figure 1). In ZZ larvae, at stage 53, germ cells migrate from the cortex toward the medulla. Together with differentiating Sertoli cells, they will constitute units named cysts that are themselves included into lobules (Figure 1). The cortex devoid of germ cells becomes albuginea, the testis envelope.

Genetic sex determination in *P. waltl* can be counteracted by temperature (12). For maximal efficiency, temperature should be maintained at 32°C from stage 42 to stage 54, a developmental window defined as the thermosensitive period (Figure 1) (13). Both Wolffian and Mül-

lerian ducts are present in ZZ and ZW larvae (Figure 1). After metamorphosis (stage 56), in the case of ovary differentiation, estrogens will induce the differentiation of the Müllerian ducts into oviducts. In contrast to amniotes, Müllerian ducts will not disappear in ZZ larvae, and they can even differentiate into oviducts in the case of experimentally administrated estrogens.

Our aim was to determine whether MIS was expressed in *P. waltl* and to study its pattern of expression during normal development and sex reversal situations. Our results show that MIS is expressed in that species in which Müllerian ducts are maintained in males and suggest that the role of MIS on Müllerian ducts was probably acquired secondarily during the course of evolution.

Materials and Methods

P. waltl larvae and adults were reared in fresh water at 20°C ± 2°C. The Animal Care and Use Committee of Lorraine approved the experimental protocols, and guidelines for laboratory procedures were followed at all times. Developmental stages were

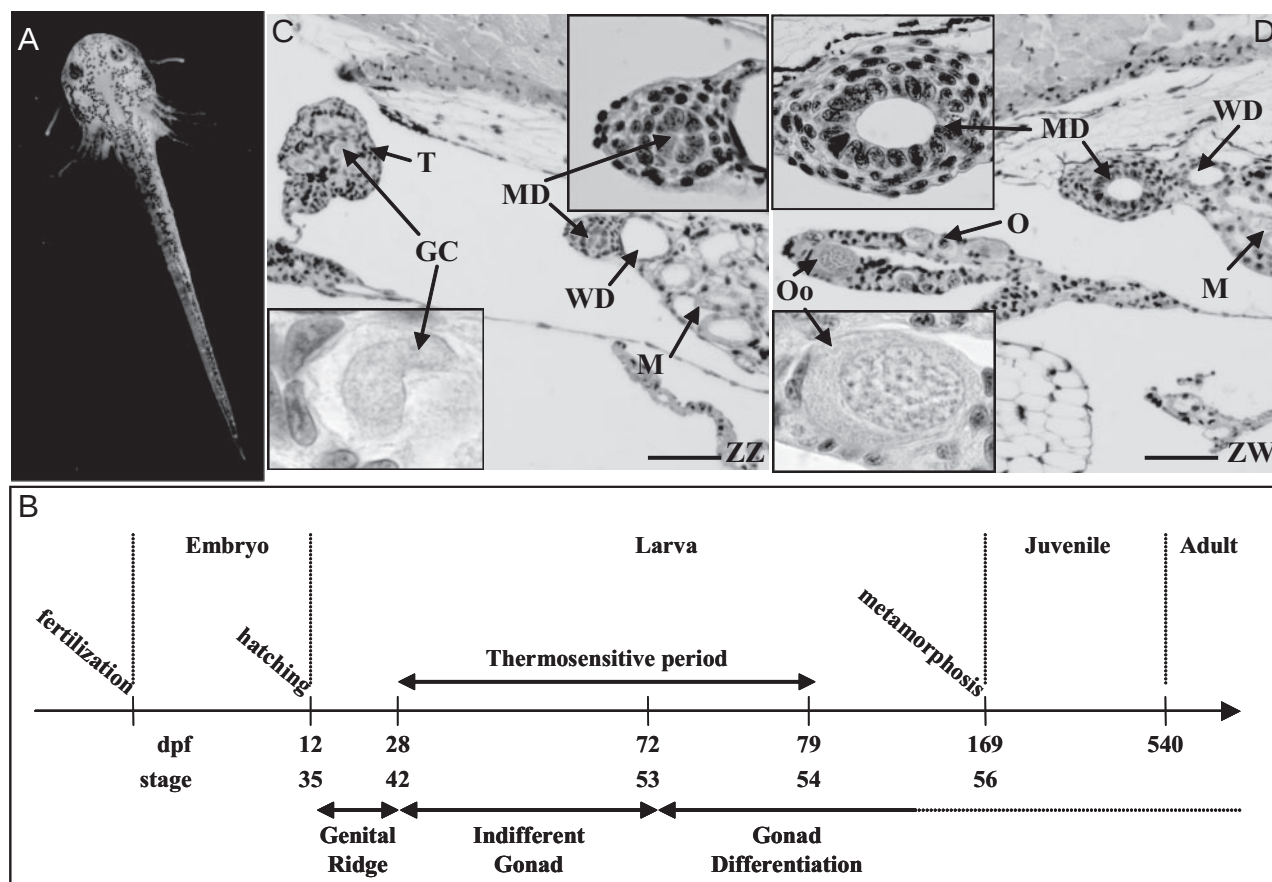


Figure 1. A, *P. waltl* larva. B, Timetable of *P. waltl* development. C and D, Histological sections of a male (ZZ) and a female (ZW) at the time of metamorphosis. On each picture, 2 inserts show at higher magnification, respectively, the Müllerian duct and 1 germ cell (nonmeiotic with a polylobular nucleus in the male and meiotic in the female). Abbreviations: dpf, days post fertilization; GC, germ cell; M, mesonephros; MD, Müllerian duct; O, ovary; Oo, oocyte; T, testis; WD, Wolffian duct. Scale bars, 50 μm.

determined by macroscopic observation (14). The sexual genotype was identified by electrophoretic patterning of the sex-linked peptidase-1 (15).

Juvenile testis MIS cDNA was PCR-amplified with degenerate primers 5'-TGCTTYACGMGNATGTTYCC-3' and 5'-CCRCAYTCYTCNGCNACCATRTG-3' with slight modifications of a previously described protocol (16). Briefly, the hybridization temperature of the touchdown PCR program was lowered from 60°C to 50°C, and amplification was pursued with 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 1.5 minutes.

The detailed protocols for RNA extraction, reverse transcription, and PCR have been described previously (17, 18). The primers used are shown in Supplemental Table 1 (published on The Endocrine Society's Journals Online website at <http://endo.endojournals.org>).

For in situ hybridization, testes were fixed during 16 hours in paraformaldehyde (4%) (Sigma-Aldrich) prepared in 75mM phosphate buffer, embedded in Tissue-Tek O.C.T. (QIAGEN). A 238-bp MIS sequence (nucleotides 366–603) was inserted into a pGEM-T Easy (Promega) vector, which was used to generate

digoxigenin-labeled RNA probes (Supplemental Table 1). Anti-sense and/or sense probes were diluted with hybridization buffer to 3.6 ng/μL, denatured at 95°C for 5 minutes, and applied on the cryosections (10 μm thickness) overnight at 55°C. After ribonuclease treatment and washes in formamide-containing (Sigma-Aldrich) buffer (30%), sections were saturated with blocking buffer for 1 hour before an overnight application of the alkaline phosphatase-conjugated antidigoxigenin antibody (Fab fragment; Roche) (1/500, 4°C). Phosphatase activity was revealed with Nitro blue tetrazolium-5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT-BCIP) (Roche).

Organotypic cultures were performed in Leibovitz L15 medium supplemented with L-glutamine (2mM), penicillin (10 IU/mL), and streptomycin (10 μg/mL), at room temperature (20°C ± 2°C). Testes and liver were harvested from adult males. After 8 or 24 hours, conditioned medium was obtained after centrifugation (3000 rpm). After addition of 2× Laemmli sample buffer (vol/vol), samples were subjected to electrophoresis and Western blotting as reported previously (19).

Gene expression is expressed as mean ± SEM from several samples as indicated in the text. Differences among groups were

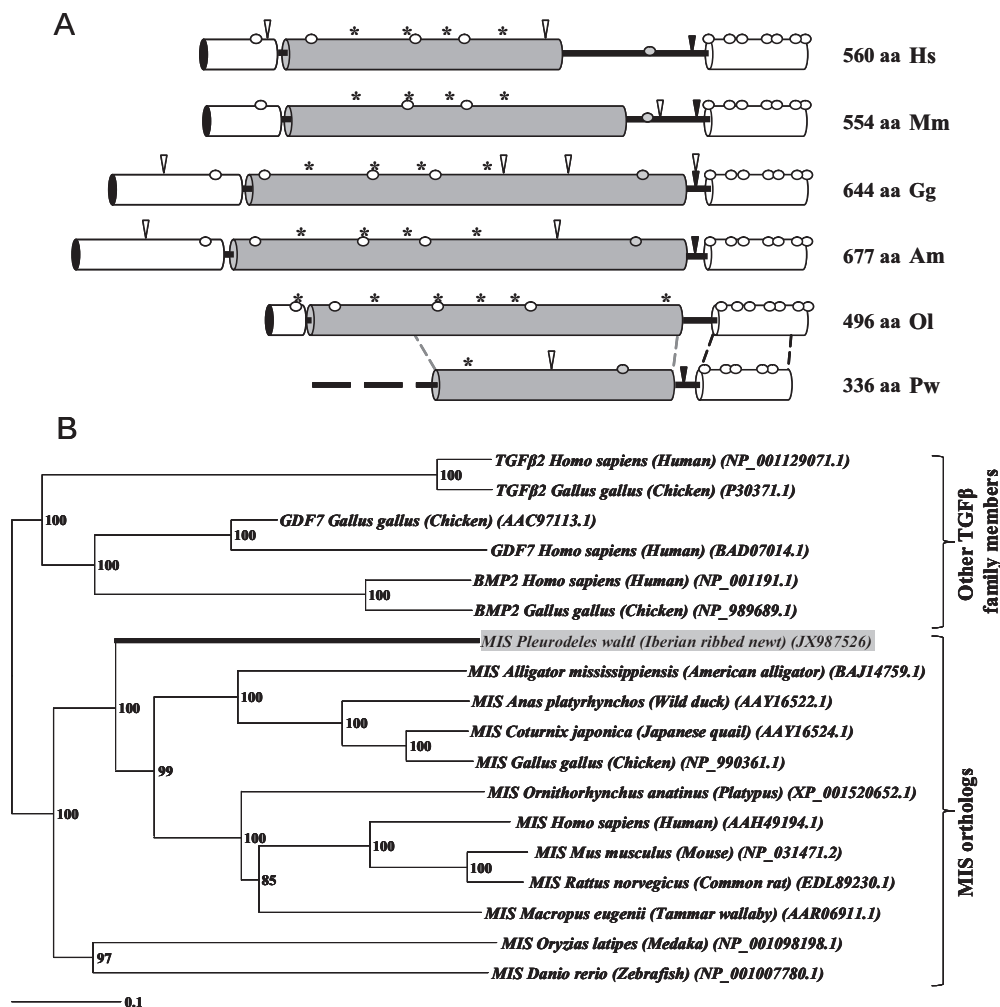


Figure 2. *P. waltl* MIS protein structure and phylogenetic analysis. A, Schematic representation of MIS from several vertebrates depicting signal peptide (dotted cylinder), MIS domain (gray cylinder), TGF-β domain (white cylinder), conserved cysteines (white circles), position of introns (asterisks), cleavage site (black triangles), and N-glycosylation sites (white triangles). B, Phylogenetic tree showing the relations between *P. waltl* MIS and MIS of other species. We used the Phylowin software and applied a bootstrap test of 500 replicates to check the robustness of the phylogram. Bootstrapping values, distance scale, and Genbank accession numbers are given. Scale bar, 0.1 substitution per site.

tested using ANOVA and the Bonferroni least-significant difference test (SPSS version 12.0 software).

Results and Discussion

Using degenerate primers that were designed from conserved regions of vertebrate MIS cDNA sequences, we amplified a 1008-bp MIS cDNA fragment of *P. waltl*. This fragment was then cloned into a pGEM-T Easy Vector System (Promega) and sequenced (GenBank accession number JX987526). The deduced amino acid sequence contained 336 residues, with the typical TGF- β domain at the C terminus and the main part of the MIS domain usually located in the middle of the protein (Figure 2A and Supplemental Figure 1). The amphibian MIS sequence had

an overall amino acid similarity of 34% to chicken, 33% to alligator, 32% to platypus, 24% to human or mouse, 23% to zebrafish, and only 16% to medaka. Amino acid similarity was higher in the proteolytically cleaved mature C terminus: 44% to chicken and platypus, 38% to mouse, 37% to alligator, 33% to human, 26% to zebrafish, and 20% to medaka. The predicted plasmin cleavage site (R/K-XX-R/K) between the N terminus and the mature C terminus was located between amino acids 235 and 238 (RQNR/STG). Finally, analysis of cysteine distribution throughout the *P. waltl* MIS protein showed that 5 of the 7 cysteines usually found in the C-terminal MIS fragment of most vertebrates were in conserved positions (Figure 2A and Supplemental Figure 1).

The partial MIS amino acid sequence of *P. waltl* was used to construct a phylogenetic tree using the Phylowin software (20). The amphibian MIS clusters within the clade of MIS proteins, well separated from other members of the TGF- β family (Figure 2B). Thus, the gene we have identified in *P. waltl* has the phylogenetic properties and structural features expected for an MIS ortholog.

To determine the expression pattern of MIS during development, we conducted real-time PCR analyses. We found a higher level of MIS mRNA expression in male than in female gonad-mesonephros samples before (1.7-fold at stage 50, $P < .01$) and during gonad differentiation (3.6-fold at stage 54, $P < .01$) (Figure 3A). At stage (54+60d) when differentiated gonads were big enough to be analyzed separately from the mesonephros, this differential expression was more important (12.5-fold, $P < .01$) (Figure 3A). After metamorphosis, the level of MIS mRNA decreased in the testis in which the expression level appeared similar to that observed in the ovary (data not shown). In adult tissues, MIS mRNA was detected only in the gonads and was found not only in the testis but also in the ovary (Figure 3B).

To determine which testis compartment expressed MIS in the testis, we performed in situ hybridization. Testes of young juvenile animals were fixed in 4% paraformaldehyde

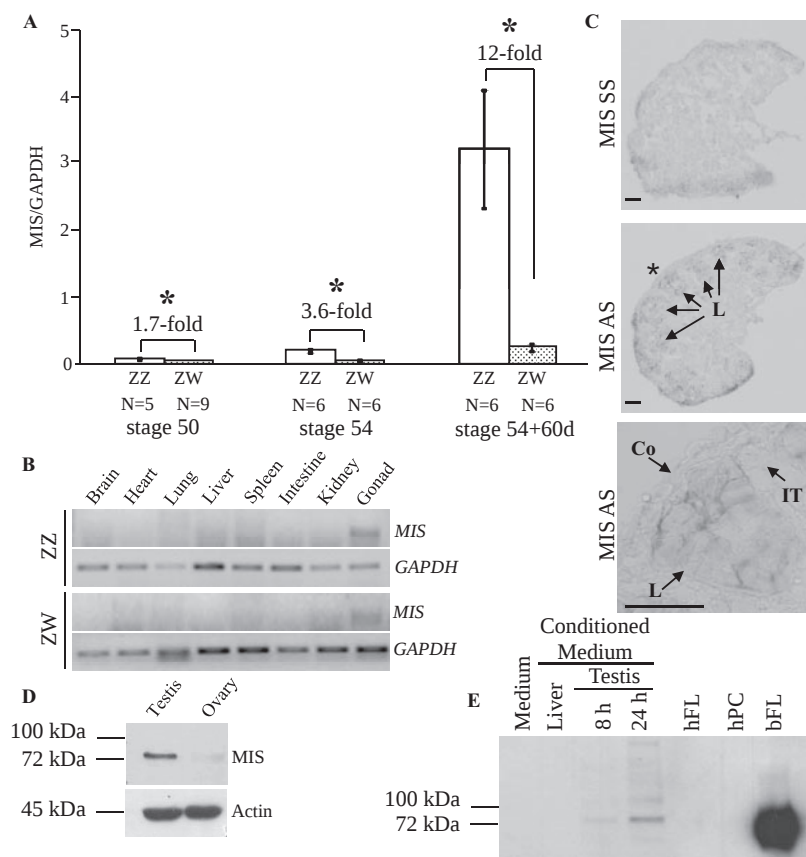


Figure 3. MIS mRNA expression. A, Real-time PCR analysis. Samples were pools of 4 gonad-mesonephros complexes for larvae before (stage 50) and at the beginning (stage 54) of gonad differentiation; they consisted of gonads only during the differentiation process (stage 54+60d). *, Significantly different from ZW samples ($P < .05$). B, RT-PCR analysis of different organs from an adult male and an adult female. C, In situ hybridization performed on testis sections of a young juvenile male. The lobule indicated by the asterisks is shown enlarged in the picture at the bottom. Bars, 50 μ m. D, Western blot analysis of MIS expression in adult gonads. Actin is used as a loading control. E, Western blot analysis of MIS expression in conditioned medium. The analysis was performed on media conditioned by liver and testes from *P. waltl* adult males for 8 or 24 hours. Medium alone and recombinant human MIS were used as negative controls. Recombinant bovine MIS (full length = bFL) was used as positive control. Abbreviations: AS, antisense probe; Co, cortex; hFL, human full-length; hPC, human plasmin-cleaved; IT, interstitial tissue; L, lobule; SS, sense probe.

and cryosectioned. At this stage, the gonads contain lobules surrounded by interstitial tissue producing steroids. Within the lobules, germ cells are associated with somatic cells corresponding to Sertoli cells (21). Expression of MIS was detected in the lobules, in the position expected for Sertoli cells (Figure 3C).

To determine whether the MIS protein could be translated and secreted in *P. waltl* testis, we performed organotypic cultures and Western blot analyses. In adult testis, a monoclonal anti-bovine MIS antibody (Mab 168) that cross-reacts with ovine and caprine MIS detected a protein with a molecular mass similar to bovine MIS (72 kDa) (19). The intensity of this band was very low in the ovary (Figure 3D). In *P. waltl* adult testis-conditioned medium, the antibody detected a protein with a molecular mass similar to recombinant bovine MIS (72 kDa). No signal was observed in male liver-conditioned medium or in non-conditioned medium (Figure 3E). This suggested that *P. waltl* MIS protein could be translated and secreted.

We also studied MIS mRNA expression during treatments known to induce sex reversal. First, ZW larvae were grown at 32°C from stage 42 to 54 to induce a female to male sex reversal (13). At stage 54+60d, our real-time PCR analyses revealed that such a treatment induced a 3.6-fold increase in MIS mRNA gonadal expression in comparison with control ZW larvae (Figure 4A). At the same stage, to ascertain sex reversal, we studied the expression of aromatase, the estrogen-synthesizing enzyme, which is known to decrease in case of a masculinizing heat treatment (17, 22). As expected, a 7.7-fold decrease in gonadal aromatase expression was observed (Figure 4A). Sex reversal was confirmed by the absence of the recombinase disrupted meiotic cDNA 1 (DMC1) that is a meiosis entry marker specific of ovary differentiation at this stage (Figure 4A). We then studied ZZ larvae exposed to estradiol (E_2) from stage 51 to 54, a treatment known to have a feminizing action (12). At stage 56, we observed that MIS mRNA gonadal expression was inhibited in individuals exposed to E_2 at 100 $\mu\text{g/L}$, whereas it was not modified in the case of exposure to 1 $\mu\text{g/mL}$ E_2 (Figure 4B). The inhibition of MIS mRNA expression was in agreement with the feminizing effect observed only in response to a high dose of E_2 . Indeed, sex-reversed individuals expressed a high level of aromatase and the meiosis entry marker DMC1 (Figure 4B).

This work is the first to describe MIS in an amphibian species. Furthermore, our findings show that *P. waltl* is an original vertebrate in which males maintain Müllerian ducts despite the expression of MIS. These are new data following those showing the existence of MIS in medaka, a species without Müllerian ducts. Thus, it appears that the primitive function of MIS was to play a role in testis

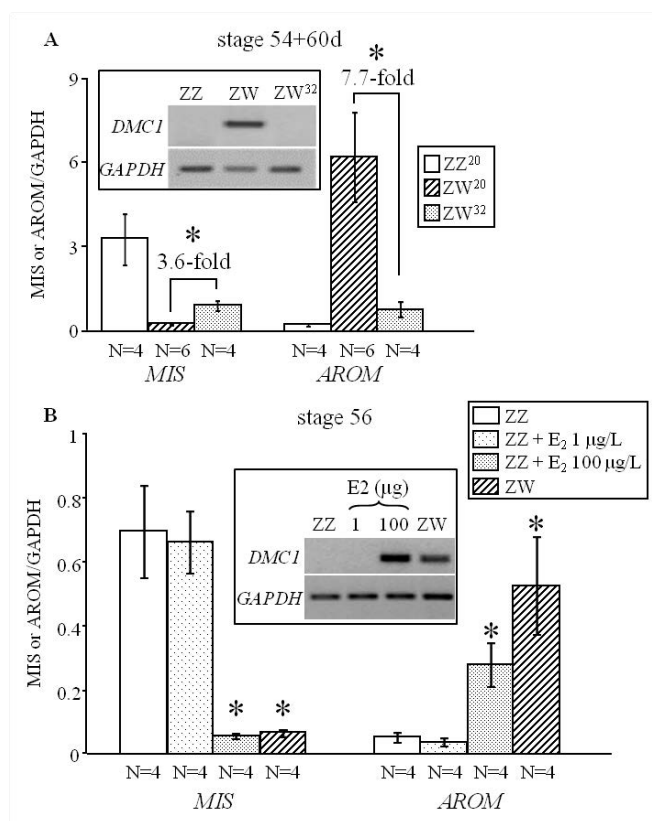


Figure 4. MIS mRNA expression in the case of sex reversal. A, Real-time PCR analysis of MIS and aromatase (AROM) expression at stage 54+60d in gonads of control larvae reared at 20°C (genetic males ZZ²⁰, genetic females ZW²⁰) and genetic female larvae reared at 32°C (ZW³²). *, Significantly different from control females (ZW²⁰) ($P < .05$). B, Real-time PCR analysis of MIS and aromatase expression at stage 56 in gonads of control larvae (genetic males ZZ, genetic females ZW) and E_2 benzoate-treated genetic male larvae (ZZ + E_2). *, Significantly different from control males (ZZ). The insets show the expression of the meiosis entry marker DMC1 that is specific of ovarian differentiation at this stage.

differentiation and that its property to induce Müllerian duct regression was probably acquired later during the course of evolution. The timing of MIS-increased expression in the differentiating testis of *P. waltl* could be related to a role in the control of germ cell proliferation as recently highlighted in the medaka (9–11). The production of MIS in *P. waltl* testis could also explain why experimental parabiosis associating genetically male and female embryos can mimic the well-known freemartinism observed in cattle (23–26). In the latter, the masculinized XX (genetically female) embryo is thought to arise due to the passage of MIS from the male (XY) twin via placental anastomoses. In a *P. waltl* parabiosis model, in the case of ZZ/ZW associations, at stage 54+60d, germ cell numbers in the ZW gonad were similar to those observed in the ZZ gonad and 2-fold lower than in a control ZW gonad (26). Recombinant MIS from *P. waltl* could be used in organotypic cultures of gonads to test the role of the hormone on

germ cell proliferation. It might be interesting now to study MIS receptors in *P. waltil* because an expression in the gonad would be in agreement with a role in gonad differentiation. It might be also interesting to determine whether other members of the Caudata are also MISsed amphibians.

Acknowledgments

We thank N. Arouche, M. Chillet, and A. Kleinclauss for technical assistance and/or animal rearing. We also thank Professor S. N. Thornton for English editing.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof S. Flament, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN) Unité Mixte de Recherche 7039, Entrée 1B, Neuvième Étage, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France. E-mail: stephane.flament@univ-lorraine.fr.

This work was performed using materials obtained with grants from the Ligue Contre le Cancer (Comités de la Meurthe et Moselle, de la Haute Marne et de la Meuse), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Conseil Régional de Lorraine, and the Université de Lorraine. I.A.-A. was the recipient of a Syrian government fellowship (decision 1033).

A.C. advised on molecular biology. D.C. contributed to the cloning, sex-reversing treatments, and the RT-PCR studies. H.D. contributed to the cloning. I.A.-A. performed all the studies except the Western blotting and performed the statistical analysis. J.-Y.P. provided antibodies, and N.d.C. performed the Western blot studies. S.F. supervised the studies, performed organotypic cultures, harvested tissues, and wrote the manuscript. All authors performed critical reading of the manuscript.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Microsc Morph Exp*. 1947;36:271–315.
- Josso N, Picard JY, Rey R, di Clemente N. Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2006;3:347–358.
- Josso N, di Clemente N, Gouédard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;179:25–32.
- Belville C, Josso N, Picard JY. Persistence of Müllerian derivatives in males. *Am J Med Genet*. 1999;89:218–223.
- Belville C, Van Vlijmen H, Ehrenfels C, et al. Mutations of the anti-Müllerian hormone gene in patients with persistent müllerian duct syndrome: biosynthesis, secretion, and processing of the abnormal proteins and analysis using a three-dimensional model. *Mol Endocrinol*. 2004;18:708–721.
- Belville C, Maréchal JD, Penetier S, et al. Natural mutations of the anti-Müllerian hormone type II receptor found in persistent Müllerian duct syndrome affect ligand binding, signal transduction and cellular transport. *Hum Mol Genet*. 2009;18:3002–3013.
- di Clemente N, Belville C. Anti-Müllerian hormone receptor defect. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20:599–610.
- Morrish BC, Sinclair AH. Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction*. 2002;124:447–457.
- Morinaga C, Saito D, Nakamura S, et al. The hotei mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:9691–9696.
- Shiraishi E, Yoshinaga N, Miura T, et al. Müllerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology*. 2008;149:1813–1819.
- Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, et al. Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti-Müllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Development*. 2012;139:2283–2287.
- Dumond H, Kuntz S, Chesnel A, et al. Sexual development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltil*. *Sex Dev*. 2008;2:104–114.
- Dournon C, Houillon C. Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltilii* Michah. *Reprod Nutr Dev*. 1985;24:671–688.
- Gallien L, Durocher M. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltil*. *Bull Biol Fr Belg*. 1957;91:97–114.
- Dournon C, Collenot A, Lauthier M. Sex-linked peptidase-1 patterns in *Pleurodeles waltilii* Michah (Urodele Amphibian): genetic evidence for a new codominant allele on the W sex chromosome and identification of ZZ, ZW and WW sexual genotypes. *Reprod Nutr Dev*. 1988;28:979–987.
- Al-Asaad I, Dumond H, Chardard D, Chesnel A, Flament S. Busulfan-mediated germ cell depletion does not alter gonad differentiation in the urodele amphibian *Pleurodeles waltil*. *Sex Dev*. 2012;6:188–200.
- Kuntz S, Chesnel A, Duterque-Coquillaud M, et al. Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltil*. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;84:89–100.
- Dumond H, Al-Asaad I, Chesnel A, et al. Temporal and spatial SOX9 expression patterns in the course of gonad development of the caudate amphibian *Pleurodeles waltil*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2011;316:199–211.
- Legeai L, Vigier B, Tran D, Picard JY, Josso N. Monoclonal antibodies raised against bovine anti-Müllerian hormone: bovine, ovine, and caprine hormones share a set of identical epitopes. *Biol Reprod*. 1986;35:1217–1225.
- Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci*. 1996;12:543–548.
- Flament S, Dumond H, Chardard D, Chesnel A. A Lifelong testicular differentiation in *Pleurodeles waltil* (Amphibia, Caudata). *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:21.
- Ko CI, Chesnel A, Mazerbourg S, Kuntz S, Flament S, Chardard D. Female-enriched expression of ER α during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltil*. *Gen Comp Endocrinol*. 2008;156:234–245.
- Jost A, Vigier B, Prepin J. Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. *J Reprod Fertil*. 1972;29:349–379.
- Capel B, Coveney D. Frank Lillie's freemartin: illuminating the pathway to 21st century reproductive endocrinology. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2004;301:853–856.
- Josso N. Professor Alfred Jost: the builder of modern sex differentiation. *Sex Dev*. 2008;2:55–63.
- Dumond H, Maufroid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A, Flament S. Freemartin in the amphibian *Pleurodeles waltil*: parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. *Mol Reprod Dev*. 2008;75:439–449.

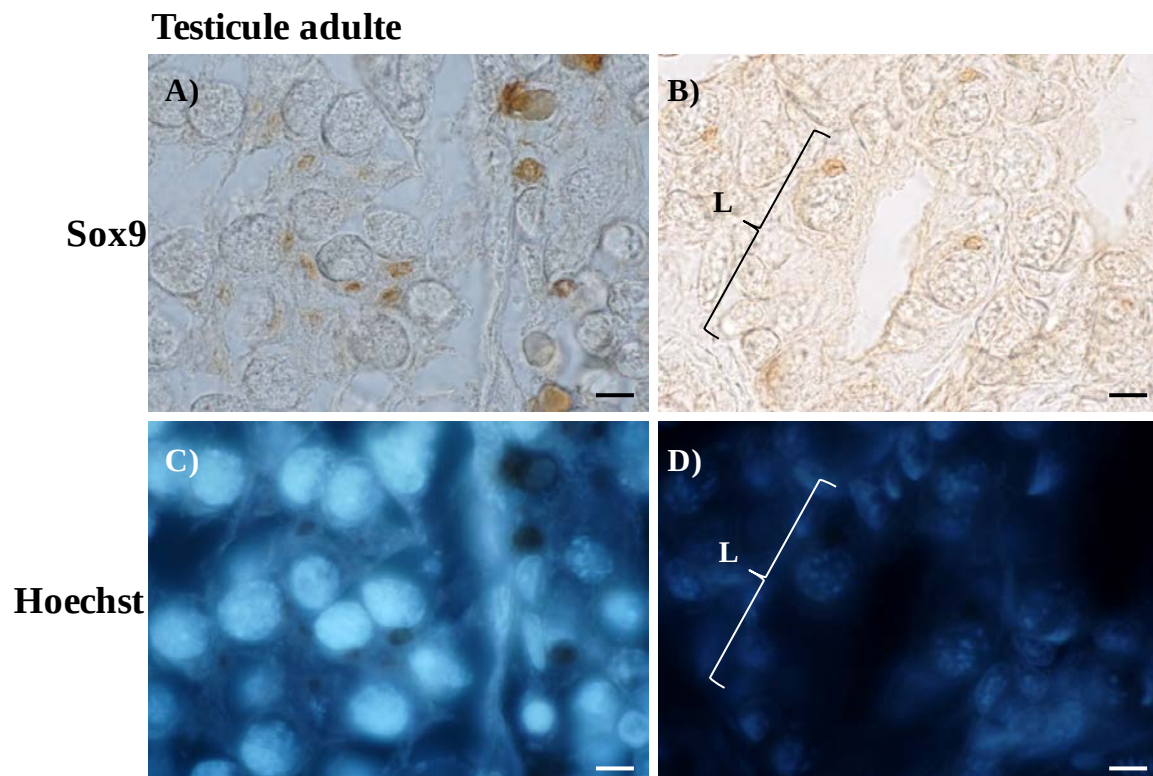


Figure 57 : Localisation de l'expression de Sox9 dans le testicule adulte de pleurodèle. Immunohistologie réalisée à l'aide d'un anti-SOX9 humaine (A,B) ; contre-coloration au hoechst (C, D). **A, C)** lobules (L) au début de la spermatogenèse, **B, D)** lobules au milieu de la spermatogenèse. L'anticorps marque une structure cytoplasmique granulaire située près du noyau des spermatogonies. Barres = 25 μ m.

I.3) Données supplémentaires concernant les études de Sox9 et Amh

- En appliquant l'anticorps dirigé contre la protéine SOX9 humaine sur des coupes de testicules adultes de pleurodèle, nous avons observé le marquage d'une structure cytoplasmique granulaire près du noyau des spermatogonies en prolifération (Figure 57). Ces points fortement marqués par SOX9 ne sont pas marqués par le Hoechst, un intercalant de l'ADN. Pour déterminer la nature des structures marquées il faudrait réaliser des études sur un microscope électronique.

- Afin d'obtenir plus de données sur la protéine Amh de pleurodèle, nous avons utilisé en immunohistochimie l'anticorps dirigé contre l'AMH bovine (AMHb 168) mais celui-ci n'a donné aucun résultat (Figure 58).

- Nous avons aussi testé un anticorps dirigé contre l'AMH de poulet, que nous ont fourni les docteurs N. di Clemente et JY. Picard (INSERM Clamart). En western blot celui-ci révèle une forte bande d'environ 70kDa et trois bandes plus faibles entre 27 et 40 kDa. En immunohistochimie, utilisé à la concentration de 1/2500^{ème}, il a donné un marquage très fort au niveau du cytoplasme des CG du testicule juvénile mais pas au niveau des cellules somatiques (Figure 58).

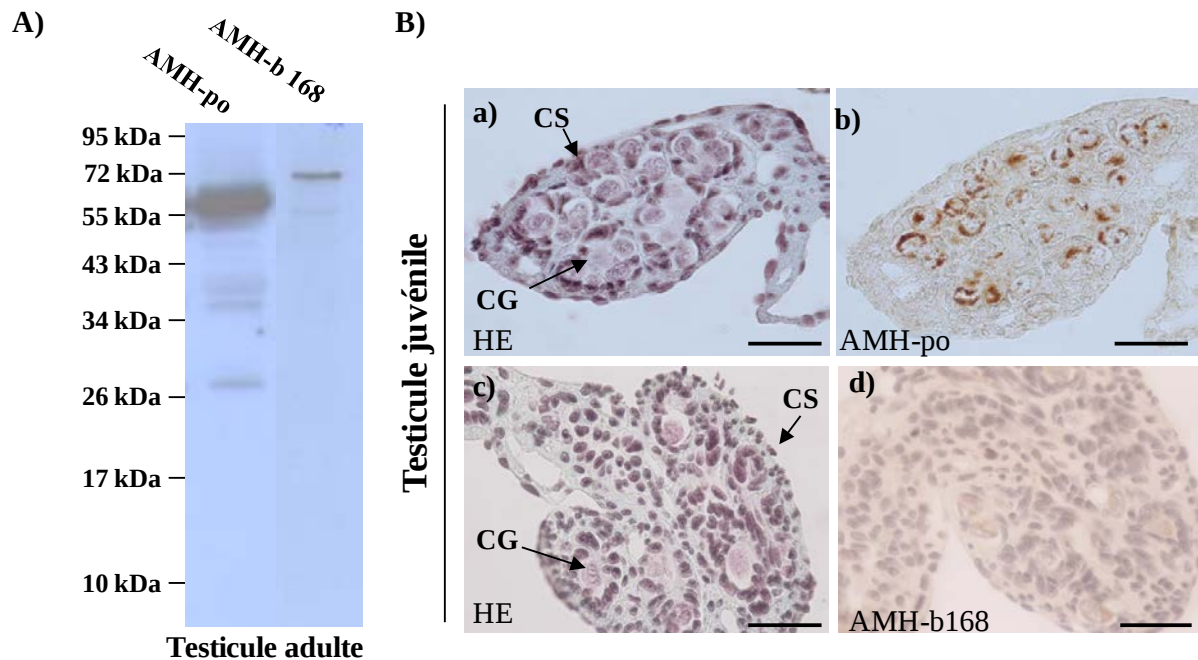


Figure 58 : Expression de l'Amh dans la gonade mâle de pleurodèle. Plusieurs anticorps dirigés contre l'AMH de différentes espèces ont été testés. **A)** En western blot dans le testicule adulte, l'anti-AMH de poulet (AMH-po) révèle une forte bande d'environ 60kDa et trois bandes plus faibles entre 27 et 40 kDa. L'anti-AMH bovine (AMH-b168) révèle une forte bande vers 72 kDa. **B)** En immunohistochimie, un marquage très fort au niveau du cytoplasme des CG du testicule juvénile mais pas au niveau des cellules somatiques (CS) est obtenu avec l'AMH-po **(b)**. Coupes colorées par l'hématoxyline-éosine (HE) **(a,c)**. L'anticorps anti-AMH bovine ne marque aucune structure **(d)**. Les concentrations utilisées sont les suivantes : AMH-po : 1/2500^{ème}, AMH-b : 1/500^{ème}. Barres = 50 µm.

II. Etude de développement gonadique sans cellules germinales chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*

Cette partie de ma thèse décrit l'effet d'un traitement au busulfan, sur le développement gonadique chez l'amphibien *P.waltl*. En effet, le rôle des CG a été étudié chez la majorité de vertébrés mais aucune étude sur ce rôle lors du développement gonadique chez les urodèles n'avait été publiée. Cette étude est présentée sous forme d'un article paru dans (Sexual Development, 6: 188-200, 2012). Des résultats supplémentaires ont été cités juste après l'article 3 avec les figures correspondantes.

II.1) Etude de l'effet de l'absence de cellules germinales au cours du développement gonadique chez l'amphibien *Pleurodeles waltl*

II.1.1) Introduction

Les cellules somatiques ainsi que les CG jouent un rôle important lors de la différenciation des gonades. Afin de déterminer le rôle de CG au cours de la différenciation gonadique, différentes méthodes ont été utilisées afin de les éliminer chez plusieurs vertébrés, tels que l'irradiation γ , l'inactivation de gènes impliqués dans la survie et la migration des CG ou bien le traitement par le Bu, agent alkylant initialement utilisé dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques. Chez les mammifères mâles, la perte de CG n'affecte ni le développement des testicules ni la différenciation des cellules somatiques, bien qu'une organisation retardée des cordons testiculaires ait été observée (McLaren, 1991). Cependant, la perte de CG avant la différenciation des gonades XX indique que les CG sont essentielles à la différenciation ovarienne : les cordons ovigères appauvris en CG apparaissent mais ils ne se décomposent pas en follicules et peuvent rester plusieurs mois après la naissance dans la gonade avant de régresser (Mazaud *et al.*, 2002; Guigon & Magre, 2006). Par ailleurs, lorsque la perte de CG se produit au stade de la méiose chez les rats XX, elle peut induire une inversion sexuelle caractérisée par la présence de cordons séminifères dans l'ovaire, se composant de cellules présentant les caractéristiques morphologiques des cellules de Sertoli (Guigon *et al.*, 2005).

Chez les oiseaux, lorsque les CGP des embryons à 23-45 heures d'incubation sont éliminées, une différenciation sexuelle normale a été observée à 15 et 20 jours d'incubation dans le testicule et l'ovaire appauvris en CG respectivement (McCarrey & Abbott, 1978). Par

ailleurs, la différenciation endocrinienne des testicules et des ovaires n'est pas altérée en absence des CG (McCarrey & Abbott, 1982). De même, chez la tortue *Trachemys scripta*, le Bu induit une absence de CG qui ne modifie pas le développement morphologique des testicules ou des ovaires fœtaux (DiNapoli & Capel, 2007).

Chez les poissons, des résultats contradictoires ont été obtenus sur l'effet de l'absence de CG. Ainsi, chez le medaka, après traitement par le Bu, le testicule contient des précurseurs des tubes séminifères dépourvus de CG, alors que dans l'ovaire aucun follicule n'a été observé mais une cavité ovarienne bien développée se forme (Shinomiya *et al.*, 2001). En revanche, une inversion sexuelle femelle-mâle a été remarquée chez les medakas appauvris en CG via l'injection de MOs dirigés contre *cxc4* (Kurokawa *et al.*, 2007). Ces poissons déficients en CG montrent des caractères sexuels secondaires masculins, accompagnés par une augmentation des androgènes et une réduction des œstrogènes. Chez le poisson zèbre, une perturbation ciblée des CG, obtenue par deux méthodes différentes, conduit également à une inversion sexuelle femelle-mâle (Slanchev *et al.*, 2005).

Chez les amphibiens, la déplétion de CG n'a été effectuée que chez les anoues. L'irradiation UV du pôle végétatif de l'œuf a été utilisée chez *Rana japonica* et *R. brevipoda* (Shirane, 1982). Au moment de la maturité sexuelle, la sex-ratio montre une inversion sexuelle femelle-mâle seulement chez *R. brevipoda* (Shirane, 1982). Récemment, il a été montré que le Bu conduit à une absence totale de CG chez *X. laevis* sans effets dégénératifs sur le compartiment somatique chez les têtards, ce qui permet d'obtenir des individus matures mais stériles au cours du développement (Piprek *et al.*, 2012). En ce qui concerne le développement gonadique sans CG chez *X. laevis*, Piprek *et al.* ont montré que le développement testiculaire se poursuit en formant les tubes séminifères parmi les cellules de Sertoli, alors qu'au cours de la différenciation ovarienne aucun follicule n'a été formé chez les traités Bu, suggérant l'importance de CG pendant le développement des ovaires de *X. laevis* (Piprek *et al.*, 2012).

Enfin, le rôle de CG au cours du développement gonadique chez les urodèles n'a jamais été décrit.

II.1.2) Principaux résultats

Tout d'abord, nous avons cloné l'ADNc *Pwvasa* (GenBank FJ445746) afin de disposer d'un marqueur de CG. L'amplification a été réalisée à partir d'ARN de testicule juvénile par RT-

PCR dégénérée puis par RACE-PCR. L'ADNc *Pwvasa* obtenu comporte une ORF potentielle codant une protéine de 727 acides aminés. Cette séquence montre une haute homologie avec celle d'un autre amphibien urodèle, *A. mexicanum*, avec 75% d'identité, alors que l'homologie avec l'anoure *X. laevis* est seulement de 53%. L'homologie de la séquence de Vasa du pleurodèle avec celles de la souris, l'homme, le poulet et le poisson zèbre, varient de 55% à 56% et de 48% à 53% respectivement. PwVasa, comme les protéines à boîte DEAD, possède les neuf motifs conservés (Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V et VI) et d'autres caractéristiques de cette famille. L'arbre phylogénétique montre que la séquence de Vasa de pleurodèles est clairement apparentée aux orthologues clonés chez les vertébrés. En plus, les analyses d'expression par RT-PCR chez le pleurodèle démontrent qu'au cours du développement embryonnaire, *vasa* ne montre une expression spécifique de la gonade qu'au stade 35 puisqu'un transcrit maternel est présent dès le début du développement embryonnaire.

Ensuite, la déplétion des CG a été induite chez le pleurodèle par le Bu (diméthanesulfonate de butane-1,4-diyle). Cet agent alkylant a été ajouté dans l'eau d'élevage des animaux pendant 3 jours au moment de l'éclosion (stade 35). Deux concentrations de 50 µg/ml et 25 µg/ml ont été testées mais la deuxième était mieux tolérée. Ce traitement induit la perte progressive des CG chez les deux sexes, attesté en RT-PCR par une réduction de l'expression de *PwVasa* et à l'examen microscopique par une diminution du nombre de CG au cours du développement. Ces CG sont complètement absentes au stade 54 et 54+60j dans les gonades ZW et ZZ, respectivement.

En absence de CG, nous avons étudié la différenciation gonadique. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la gonade ZW témoin au stade 54 est caractérisée par une cavité centrale due à la dégénérescence médullaire et par un cortex contenant de nombreuses CG reconnaissables à leur grande taille et à leur noyau polylobé. Au stade 54+60j, la gonade ZW possède une cavité ovarienne plus développée, ainsi qu'un cortex comprenant deux couches de cellules somatiques : interne provenant de la médulla, et externe correspondant à l'épithélium coelomique. Entre ces deux couches, se localisent les CG dont la plupart sont entrées en méiose. Dans cette étude, nous avons montré que malgré l'absence de CG, les gonades ZW traitées Bu possèdent, au stade 54, un phénotype ovarien reconnaissable par la cavité centrale avec au stade 54+60j, deux couches de cellules somatiques formant le cortex dont les CG sont absentes.

D'autre part, aux stades 54 et 54+60j, les gonades ZZ témoins ont un phénotype facile à identifier par la présence d'un cortex mince et une médulla centrale épaisse composant les

CG, alors que les gonades ZZ traitées Bu possèdent les mêmes caractéristiques mais dépourvues de CG.

Afin de confirmer l'effet de CG sur le compartiment somatique des gonades traitées, nous avons effectué une analyse de l'aromatase par PCR en temps réel. Nous avons montré qu'au stade 54+60j dans les complexes GM, l'expression de l'aromatase est identique, d'une part, entre les larves ZW témoins et ZW traitées Bu, et d'autre part, entre les larves ZZ témoins et ZZ traitées Bu. Ces résultats suggèrent que la disparition de CG n'affecte pas l'expression somatique de l'aromatase.

Nous avons étudié également les testicules juvéniles d'individus ZZ qui avaient été traités au Bu en montrant que ces gonades possèdent les mêmes régions que dans un testicule normal : la partie antérieure du testicule attachée au poumon et la partie postérieure qui présente le premier lobe testiculaire. En plus, le phénotype testiculaire est observé avec des lobules et des ramifications des canaux efférents mais dépourvu de CG, ce qui suggère que l'absence de CG n'affecte ni la régionalisation du testicule, ni la différenciation testiculaire du pleurodèle.

II.1.3) Conclusion

Après l'isolement de *vasa* du pleurodèle, un marqueur de CG, nous avons étudié la gonadogenèse dans un modèle de déplétion de CG induit par le Bu chez le pleurodèle. Pour cela, nous avons ajouté cet agent alkylant dans l'eau d'élevage pendant 3 jours juste après l'éclosion. Nous avons montré que le Bu conduit à une perte progressive de CG chez les mâles et les femelles.

Néanmoins, le dimorphisme sexuel des gonades est observé chez les animaux traités avec un ovaire creux typique mais dépourvu de CG chez les femelles et un testicule lobulaire avec une médulla bien développée dont les CG sont absentes chez les mâles. De plus, au stade 54+60j jours, l'activité aromatase est comparable chez les femelles traitées ou non au Bu. Ces résultats indiquent que la présence des CG n'est pas requise pour la différenciation gonadique chez le pleurodèle, contrairement à d'autres espèces de vertébrés comme la souris (Guigon & Magre, 2006) ou le poisson-zèbre (Slanchev *et al.*, 2005).

Article 3.

Busulfan-Mediated Germ Cell Depletion Does Not Alter Gonad Differentiation in the Urodele Amphibian *Pleurodeles waltl*

I. Al-Asaad H. Dumond D. Chardard A. Chesnel S. Flament

Université de Lorraine Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGRETO), EA 4421, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Key Words

Amphibia • Germ cells • Gonad differentiation

Abstract

It is not known in urodele amphibians whether germ cells (GCs) are indispensable for gonadal differentiation. In order to address this question in the newt *Pleurodeles waltl*, we first cloned the ortholog of VASA which is known as a GC marker in many species. Male (ZZ) and female (ZW) larvae were then exposed to the alkylating agent busulfan (25 µg/ml for 3 days) just after hatching (stage 36). In the main body of busulfan-treated larvae, PwVASA mRNA expression decreased before gonad differentiation in both sexes (at stage 50). This suggested GC depletion which was confirmed by histology, with a complete absence of GCs observed slightly earlier in females (stage 54) than in males (stage 54 + 60 days). In busulfan-treated ZW larvae, the presence of the typical central cavity and expression of a high level of aromatase mRNA confirmed the ovarian phenotype. In busulfan-treated ZZ larvae, the presence of a medulla surrounded by a thin cortex and a low level of aromatase mRNA confirmed the testis phenotype. At the juvenile stage, efferent ducts and lobules were present in the first testis lobe. Taken together, these data suggest that GC depletion does not alter gonad differentiation in *P. waltl*.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

The somatic cells play an important role during gonad differentiation. For instance, in XY mammals, the expression of *SRY* initiates the differentiation of Sertoli cells and their organization into seminiferous testis cords in which germ cells (GCs) halt mitotically to become prospermatogonia [for review see Ewen and Koopman, 2010]. In contrast, the absence of the *SRY* gene in the XX gonad results in the differentiation of an ovary in which supporting cells become granulosa cells and GCs enter into the first meiotic prophase. When GCs fail to reach the genital ridge and get to the adrenal glands or mesonephroi, they can enter oogenesis even if their sex chromosomes are XY [Upadhyay and Zamboni, 1982]. Moreover, when XY GCs are mixed with embryonic lung cells or cultured in a simple cell culture system (non-male gonadal environment), they enter meiosis and progress into growing oocytes [McLaren and Southee, 1997; Chuma and Nakatsuji, 2001]. It has been proposed that a factor produced by the male somatic cells prevents entry of GCs to meiosis, and thus induces them to embark on spermatogenesis rather than oogenesis [Ewen and Koopman, 2010; Guerquin et al., 2010].

GCs could also play a role in gonad differentiation. In order to elucidate this point, GC ablation has been performed in various models by the use of several methods:

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
1661-5425/12/0000-0000\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/sxd

Stéphane Flament
Université de Lorraine Signalisation, Génomique et
Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGRETO), EA 4421, Faculté des Sciences
Boulevard des Aiguillettes, BP 239, FR-54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex (France)
Tel. +33 3 8368 4252, E-Mail stephane.flament@univ-lorraine.fr

γ -irradiation using either a Cobalt or a Cesium source, treatment by alkylating agents like busulfan (1,4-butenediol dimethanesulfonate), or silencing of genes involved in GC survival or migration. GC depletion could be monitored either by microscope examination or by the analysis of GC-specific markers. VASA, a well-characterized member of the DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) protein family of ATP-dependent RNA helicases, is a well-known GC marker. In organisms such as *Drosophila* and *Xenopus*, VASA is an essential cell-fate determining component in germ plasm, but it is also expressed in GCs of organisms such as mammals and urodele amphibians that use cell-cell interactions to specify the germline [Raz, 2000; Extavour and Akam, 2003; Bachvarova et al., 2004; Gustafson and Wessel, 2010]. VASA was first identified in *D. melanogaster* in which its zygotic expression is restricted to the GC lineage throughout development [Hay et al., 1988]. When the VASA gene is homozygously mutated, GC precursors, or pole cells, do not form in the embryo. The function of the VASA protein is estimated to bind target mRNAs involved in GC establishment and in oogenesis and to control the onset of translation [Styhler et al., 1998].

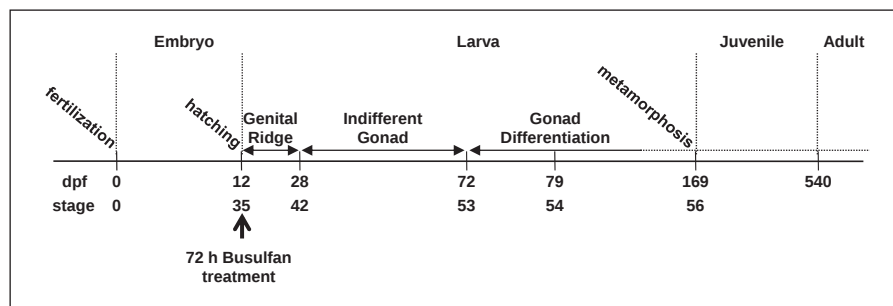
In mammals, loss of GCs does not disrupt testis development, although the organization of testis cords is delayed [for review see McLaren, 1991]. However, in the XX gonad, GC depletion before gonad differentiation (for instance by γ -irradiation on day 15 post coitum of pregnant female rats) indicates that GCs are essential for ovary differentiation: ovigerous cords and interstitial tissue appear but ovigerous cords never break down into follicular units and may persist several months after birth in the gonad before regressing [McLaren, 1991; Mazaud et al., 2002; Guigon and Magre, 2006]. Interestingly, when GC loss occurs at the meiotic stage (by γ -irradiation on 5-day post-natal XX rats), it can lead to sex reversal characterized by the presence in the ovary of seminiferous-like cords composed of cells displaying the morphological characteristics of Sertoli cells [Guigon et al., 2005].

In birds, when primordial GCs are removed from early embryos (at stages 7–11, i.e. 23–45 h of incubation) by excision of the anterior germinal crescent, normal histological sex differentiation is observed in a GC-deficient testis at 15 days of incubation and a GC-deficient ovary at 20 days of incubation [McCarrey and Abbott, 1978]. Besides, the functional differentiation (endocrine function) of both testis and ovary is not impaired in the case of GC ablation [McCarrey and Abbott, 1982]. Similarly, in the red-eared slider turtle, busulfan induces an important reduction in GC number that does not alter mor-

phological development of the fetal testis or ovary [Di-Napoli and Capel, 2007]. In fish, conflicting results have been obtained about the effects of GC depletion. In medaka, when GCs are depleted by busulfan-treatment, male gonads contained precursors of seminiferous tubules devoid of GCs, whereas in the ovary no follicles are observed but a well-developed ovarian cavity is evident [Shinomiya et al., 2001]. In contrast, a female-to-male sex reversal has been shown in GC-deficient medaka obtained by a morpholino-mediated knockdown of *cxcr4* [Kurokawa et al., 2007]. In the latter study, the GC-deficient medaka specimens show male secondary sex characteristics, accompanied by increased levels of androgen and reduced levels of estrogen. In addition, a single tube-like gonad that expresses male-specific genes is formed in these mutants irrespective of the genetic sex. In zebrafish, a targeted disruption of GCs, obtained by 2 different methods, also leads to a female-to-male sex reversal [Slanchev et al., 2005].

In amphibians, GC depletion has only been performed in a few studies in anurans. In *Rana temporaria*, UV irradiation of the vegetal pole of eggs was used, but this method was not very successful and the differentiation of the gonad was not studied [Aubry, 1953]. A similar method was used in *R. japonica* and *R. brevipoda* [Shirane, 1982]. The irradiation was performed at the 2-cell stage and GC depletion was more efficient when embryos were pressed against a quartz plate to flatten the vegetal pole. When frogs became sexually mature, the sex ratio analysis indicated a female-to-male sex reversal in *R. brevipoda*, whereas in *R. japonica*, the sex ratio deviation was not statistically significant. GC depletion has never been described in urodele amphibians. The newt *Pleurodeles waltl* shows a ZZ/ZW genetic mode of sex determination which can be influenced by temperature [Dumond et al., 2008a]. The first sign of gonad differentiation can be observed at stage 53 on histological sections. In ZW larvae, gonad differentiation results in an ovary characterized by a central cavity due to medulla regression and a developed cortex containing follicles. In ZZ larvae, GCs colonize the medulla where they associate with Sertoli cells in units named cysts that are themselves included in lobules, whereas the cortex is reduced. Many studies have been performed on the somatic cells of the gonad, especially those producing aromatase whose expression and activity are higher during ZW gonad differentiation [Chardard et al., 1995; Kuntz et al., 2003a, b; Dumond et al., 2008a; Ko et al., 2008]. In contrast, little is known about germline differentiation. Due to the lack of enough molecular markers, morphological features are often used at early stages of

Fig. 1. Timetable of *P. waltl* development. Stages and the corresponding ages (days post-fertilization) are shown for animals reared at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. The period of busulfan-treatment is also indicated.



development to study GC which are larger than somatic cells and possess a typical large polylobular nucleus [Dumont et al., 2008b; Flament et al., 2009].

The aim of the present study was to determine if GCs could play a role during gonad differentiation in *P. waltl*. First, we isolated and cloned a full-length *PwVASA* cDNA and studied its expression by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in larvae and adults. Larvae were treated with busulfan. A rapid follow-up of GC loss in busulfan-treated larvae was performed by the RT-PCR analysis of *PwVASA* mRNA expression. Gonad differentiation was then studied at different stages using histology and aromatase expression analysis. We found that GC depletion did not alter gonad differentiation in both sexes.

Materials and Methods

Animals

Adult *P. waltl* were reared in the laboratory in tap water at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and fed 3 times a week. Eggs were obtained after natural breeding. Different progenies were used in this study: standard progenies were the result of crosses between standard males (ZZ) and standard females (ZW), an all-female progeny was generated by crossing a standard male (ZZ) and a thelygenous female (WW), and an all-male progeny was generated by crossing a standard male (ZZ) and an estradiol sex-reversed male (ZZ). Larvae were reared in tanks containing 2 liters of tap water and fed 3 times a week up to analyses.

Embryos and larvae were staged (fig. 1) according to the developmental table described by Gallien and Durocher [1957]. For the studies performed from fertilization to hatching (stage 35), embryos were manually dejellied and their vitelline membrane removed using fine forceps. During larval life, gonads were analyzed up to stage $54 + 60$ days (54^{60d}). Some organs were also studied in juveniles and adults. Before tissue harvesting, animals were anesthetized with 0.03% benzocaine. The local animal care and use committee approved the experimental protocols and guidelines for laboratory procedures were followed at all times.

Treatment and Rearing

A stock solution of busulfan was prepared in DMSO (12.5 mg/ml). In vivo treatments were performed at stage 35 (fig. 1) by addition of busulfan to the rearing water (40 ml) at a final concentration of 25 or 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 3 days. Control larvae were exposed for the same time to the same amount of DMSO. After treatment, larvae were reared in tanks containing 2 liters of tap water and fed 3 times a week up to analyses. The different progenies and the number of control or busulfan-treated animals are listed in table 1.

Genotyping

For sexual genotype analysis of individuals of standard progenies, a biopsy was obtained from the tail of the animals anesthetized with 0.03% benzocaine at stage 50. The tissue was homogenized in 50 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl_2 and 25 mM NaCl buffer. Samples were electrophoresed in a 0.7% agarose stacking-10.5% starch running horizontal gel, in tris-citrate pH 8 buffer. The patterns of peptidase-1 were revealed by specific hydrolysis of valyl-leucine substrate coupled with peroxidase colored reaction as previously described [Dournon et al., 1988]. One-banded pattern indicated a ZZ genotype, whereas a 3-banded pattern indicated a ZW genotype.

Cloning

Juvenile testis *VASA* cDNA was PCR-amplified with degenerate primers 5'-TGCTCACTATCAGACTGGAATTAATTTYGAYAA-RTA-3' and 5'-AATCATATCCATCAGTCTTCCTGGNGTNSCR-CA-3'. The amplification was performed with 1 unit of Advantage II *Taq* DNA polymerase mix (Clontech, St-Germain-en-Laye, France) in PCR buffer containing 200 μM dNTP and 200 nM of each primer. Touchdown PCR program was 5 min at 94°C , 20 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1.5 min, during which the hybridization temperature was lowered from 60 to 40°C . Amplification was then pursued with 35 cycles at 94°C for 30 s, 40°C for 30 s and 72°C for 1.5 min. A cDNA fragment of 918 bp was cloned into pGEM-Teasy (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and sequenced (Cogenics Genome Express, Meylan, France).

The 3'- and 5'-cDNA-ends of *VASA* were amplified using the rapid amplification of cDNA ends strategy (SMART RACE cDNA Amplification kit, Clontech, Calif., USA). The 3'-cDNA was synthesized from 3- μg ZW larvae gonad-mesonephros complexes (GM) total RNA, and 5'-cDNA from 3- μg juvenile testis total RNA according to the manufacturer's instruction. The 3'- and 5'-primary PCR cycles were performed with the specific primers 5'-CTCTGCGCCAGATATATCAAGGCTGC-3' and 5'-CAAATGTCAGTATTGCTGGCGGCGG-3', respectively, and a universal

Table 1. Progenies used for busulfan study

Progeny	Phenotype and genotype of parents	Genotype of progeny	Number of control animals ^a	Number of busulfan-treated animals (25 µg/ml) ^a	Number of busulfan-treated animals (50 µg/ml) ^a
A	M (ZZ) × F (ZW)	ZZ + ZW	20 (2)	20 (10)	20 (0)
B	M (ZZ) × F (ZZ)	ZZ	20 (10)	40 (10)	20 (0)
C	M (ZZ) × F (ZW)	ZZ + ZW	10 (6)	30 (17)	0
D	M (ZZ) × F (ZW)	ZZ + ZW	30 (0)	29 (0)	0
E	M (ZZ) × F (ZZ)	ZZ	20 (11)	31 (13)	0
F	M (ZZ) × F (WW)	ZW	19 (9)	20 (8)	0

^aFor each group the number of animals subjected to a histological study appears in parentheses.

Table 2. List of the PCR primers

Gene	Primer name	Primer sequences 5'–3'	Tm, °C	MgCl ₂ , mM	Cycle number	Fragment length, bp
VASA	VASA-dir	5'-CAGCAGCCTTCCTTTTACCA-3'	52	2.5	40	290
	VASA-rev	5'-TCTTCCTGGAGTTGCACACAG-3'				
GAPDH	GAPDH3	5'-ACTACAAAGGACTAGGTCAGG-3'	52	2.5	24	290
	GAPDH4	5'-CCGGTATTGCACTCAACGACC-3'				

primer from the kit. A 3-step PCR amplification was performed according to the following steps: 5 cycles at 94°C for 30 s and 72°C for 3 min; 5 cycles at 94°C for 30 s, 70°C for 30 s and 72°C for 3 min; and 35 cycles at 94°C for 30 s, 68°C for 30 s and 72°C for 3 min. Nested PCR was performed with the specific primers 5'-CTGGAATTAATTTTCGATAAATATG-3' and 5'-GCAGCCTTGATATATCTGGCGC-3', and the universal primer from the kit. A 35-cycle PCR program of 94°C for 30 s, 68°C for 30 s and 72°C for 2 min was executed, and 2 fragments of 822 bp (3'-region) and 974 bp (5'-region) were recovered (QiaEX II kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) after agarose gel electrophoresis. The 3'- and 5'-fragments isolated were inserted into the vector pGEM-Teasy (Promega) and sequenced (Cogenics Genome Express).

RT-PCR

The detailed protocol for reverse transcription has been described previously [Kuntz et al., 2003a]. Samples consisted in pools for embryos (n = 3) and GM complexes of larvae at stage 54 (n = 3). Some studies were also performed on isolated trunks or isolated GM complexes at stage 54^{60d}. Analyses of adult organs were performed from 20 to 50 mg of different tissues. Total RNA was extracted from these samples using 200 µl of TRIzol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif., USA) and quantified. Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using hexamer primers and 100 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 25 µl. A 2-µl aliquot of resultant cDNA was used for PCR.

The amplification was performed with 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer containing 25 mM of each de-

oxynucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl₂ and 10 pmol of each primer in a total volume of 25 µl. Specific primers and PCR conditions for *GAPDH*, and *VASA* cDNAs are given in table 2.

PCR products (12 µl) were run in a 1% agarose gel containing 0.5 µg/ml ethidium bromide, viewed and photographed on a UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France). In some cases, PCR products were quantified using a software package (Quantity One v.4.3.1, Bio-Rad Laboratories).

Quantitative Real-Time PCR

cDNA transcribed from 1 µg of total RNA were diluted at various concentrations to establish the standard curve for quantification before performing aromatase and *GAPDH* quantitative PCR. All PCR cycles were performed with 'Opticon 2 real-time PCR detection system' (Bio-Rad Laboratories) in a final volume of 15 µl. Aromatase and *GAPDH* PCR reactions were performed using 300 nM of specific forward and reverse primers, 7.5-µl iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and 3-µl cDNA as previously described [Dumond et al., 2011]. The PCR program included enzyme activation at 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15 s and 65°C for 45 s. Cycle threshold (C_t) values obtained were converted into nanograms of cDNA using standard curve plots. Data obtained from duplicated runs for target cDNA amplification were averaged and expressed as quantity (ng). Target gene expressions were normalized with the *GAPDH* one, which presented a homogenous level among different samples. Results were represented as mean ± standard error of the mean of several groups as indicated in the figure.

Histology

Tissues were fixed in Dietrick's fixative, embedded in paraffin and sectioned at 7 μ m. Sections were stained with hematoxylin-eosin-light green. At some stages, the number of GCs per gonad was calculated by examination of all the sections of each gonad. We determined that 1 GC was present on 3 adjacent sections and consequently the total number of counted GCs was divided by 3 to obtain the number of GCs per gonad. Images of sections were obtained by the use of the LuciaG software 4.81 (Laboratory imaging, Prague, Czech Republic).

Statistical Analysis

In the experiments showing quantification of gene expression and GC numbers, the results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean from several larvae as indicated in the text. Differences among groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Differences in which p was less than 0.05 were statistically significant. When significant differences were detected, specific post-hoc comparisons between groups were examined with the least significance difference test (SPSS v11.0 Computer Software).

Results

Cloning and Expression of PwVASA

The cDNA of PwVASA homolog (GenBank accession no. FJ445746.1) was first amplified from juvenile testis RNA by degenerated RT-PCR. The 3'- and 5'-ends of the cDNA were then obtained by rapid amplification of cDNA-ends with PCR. The isolated cDNA (2,401 bp) included an ATG start site that predicted an open reading frame encoding a protein of 727 amino acids. Comparison of deduced amino acid sequence of PwVASA with those of other vertebrates shows the greatest similarity with the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum* sequence (75% identity). PwVASA has an overall identity of 56% and 55% to human and mouse, respectively, 48% to chicken, 53% to zebrafish and only 53% to *X. laevis* (fig. 2). PwVASA has the amino acids D-E-A-D in motif II (or Walker B motif), which gave the name to the DEAD-box ATP-dependent RNA helicase family. In addition to the 8 conserved motifs (I, Ia, Ib, II, III, IV, V and VI), it contains 3 other features of this family: the upstream Q motif, a GG between motifs Ia and Ib and a QxxR, where x is any amino acid, between motifs IV and V. The conserved motifs define 2 RecA-like domains involved in ATP-binding and hydrolysis and RNA unwinding. Besides, as in some other vertebrates, copies of an RGG motif were found in the PwVASA N-terminal domain. On the basis of phylogenetic amino acid sequence analysis, we observed that PwVASA is closely related to VASA from *A. mexicanum* and anuran amphibians and segre-

gates with other VASA orthologs rather than with members of the PL10 subfamily (fig. 3).

Qualitative RT-PCR showed that the VASA transcript is only expressed in GM complexes from male or female larvae at stage 54 (fig. 4A) and only in ovary or testis in adults (fig. 4B). In contrast to the situation described in tilapia and zebrafish, we did not observe sex-linked splice variants (data not shown). The VASA transcript was present in the fertilized egg and in the gastrula (fig. 4C). In developing embryos from cleavage to hatching, VASA mRNA was found in both the anterior half devoid of GC and the posterior half containing GC (fig. 4C). This ubiquitous expression could reflect the presence of maternal RNA. At hatching (stage 35) and in young larvae (stage 39), VASA mRNA expression was only observed in the medial part of the animal where genital ridges are located (fig. 4D). In conclusion, from hatching to adulthood, VASA mRNA expression is found only in GC-containing locations.

Global Effect of Busulfan

In our experiments busulfan was applied just after hatching (stage 36) for 72 h. In 2 progenies (A and B), a high concentration of busulfan was tested: 50 μ g/ml. We observed that at this concentration, busulfan had deleterious effects on the larvae: 75% of treated animals were at stages 46–48, while 68% of control larvae had already reached stage 53–54. Moreover, their weight was 55 mg ($n = 12$) versus 136 mg ($n = 16$) for controls. Besides, when treated with 50 μ g/ml of busulfan, most larvae died before stage 54. The concentration of 25 μ g/ml was better tolerated. At this concentration, we only observed a smaller weight: 140 $\pm$ 5 mg at stage 54 for control animals ($n = 45$, progenies A + D) versus 99 $\pm$ 14 mg ($n = 43$, progenies A + D) for busulfan-treated animals.

Fig. 2. Alignment of VASA protein sequences from *P. waltl* and other vertebrates, including *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *A. mexicanum*, *X. laevis*, *Danio rerio* and *Gallus gallus*. This alignment was created by 'Clustal 2.0.8 multiple sequence alignment'. The PwVASA sequence is highlighted in grey. The amino acids that are identical in all sequences are identified with points. The 8 conserved motifs and the Q motif present in all DEAD-box proteins are boxed. The DEAD sequence is located in motif II. Other features of the DEAD-box family, the GG between motifs Ia and Ib and the QxxR, where x is any amino acid, between motifs IV and V appear in bold. Asterisks indicate the 4 copies of the RGG motif in human and mouse proteins, whereas those in the *P. waltl* protein are underlined.

Homo	MGDEDWEAEIN-PHMSYVPIFEKDRYS-GENGDNFN-----RTPASSEMDGPPSRDDHFMKSGFA	60
Mus	MGDEDWEAEILKPHVSSVVPFEKDKYSSGANGDTFN-----RTSASS-EMEDGPPSRDDHFMKSGFA	61
Pleurodeles	MADEDWDSELTAGPSFSFSTPSFKLETEKAFNYNERS-----NKGGEFEFPKNDGPPSRG-FG	57
Ambystoma	MADEDWDSELTG-TSSVFPFSKLETEKAFNFQNSGLKSGSEFGERNTWVPRNRNSKNEVGHDEWNKNDAPGQRG-FG	78
Xenopus	-MEENWDTEIETE-KPTYVPNFSTLETENTDNYAYS-----NNDINNQYDSERSFGNRGGYR	57
Danio	--MDDWEEDQSPV--VSCSSFGGAGNCKSNSGETEG-----SSWMTGDSFRRGRGGGR	53
Gallus	-MEEDWDTELEQE---AAAASQGRSEEQAWMANSGRP-----NSPSLRFSSRPPSSPLSGFP	53

Homo	SGRN-FGNRDAGECNKRDNTSTMGG--FGVGKSGFNGRGSNSRFEDGSSGFWRSSNDCEDNPTNRNGFSKRGGYRDG	136
Mus	SGRS-LGSRDIGESSKENTSTTGG--FGRGKGFNGRGLNNKFEEDSSGFWKESNNDCEDNPTNRNGFSKRGGCQDG	137
Pleurodeles	ANRG--FGFKRGNRDEEGSNLFGRRGFKGRNEDSGSDYKGDSDNGPQRNGGFSRRS-FRDGNVEEFEDKKSAGRGFGHS	134
Ambystoma	AGRG--VGFQRDNQPDGGSGGFGRRGGFKNRNETAGSDSGKGE-NGPERNGSFSRRGGFRGASVAGDSGDQAGRGFGHS	155
Xenopus	SERSRPSNFNRGRSRTERRGRGFG--TNRNDNYSSEEDVFGDDERDQRRGFPRGGYNGNEDGQKPNAFRRGRGFRNE	133
Danio	GGRGGFGSGFKSEIDENGSDGGWNG--ESRGERGGRGGRGFRSGSRDENDENGNDGKWKGESRG-----RGRGGFGGS	125
Gallus	RNPSPPFGFSQNKGLGANEGLNRS--LPVQHDIIGYSGSRESVVRQNRREDQPVTRFGRGRSSGRSDFQERNSSANDPGM	130

Homo	NNSEASGPYRRGR--GSFR--GCRGGFGLGSPNNDLDPDECMQRTGGLFGSRRP-----	187
Mus	NDSEASGPYRRGR--GSFR--GCRGGFGLGSPNSEDQDQGTQGGGLFGSRKP-----	188
Pleurodeles	ENN--FAQRRGRG--TGAR--GTHGGFGRDENNDDEESQSGFSGRGGFYESRGRGGGFRGRGDENNDEENQSSFGSRG	207
Ambystoma	EDS--FGERRGRF--TGR--GTRGGFGRDENDEQRSSDDFGSKGGFND-----	199
Xenopus	NEQRRGFGRRGFRSENGQRNFDNRGDFGNSGEEEDRPRS--YG-RGGFNN-----	182
Danio	FRG--GFRDGGNEDTGRR--GFR--ENNENGND--EGGEGR-----	159
Gallus	QDQ--GFRRVPG--IFGQSKCFNSEERN-----	154

Homo	--VLSGTGNGDTSQSRSGSGSERGGYKGLNEEVITGSGKNS--WKSEABEGESSDQGPVKTYIPPPPEDEDSIFAHY	262
Mus	--AASDSNGDTSQSRSGS--RGYKGLNEEVITGSGKNS--WKSEABEGESSDQGPVKTYIPPPPEDEDSIFAHY	261
Pleurodeles	GFQITCYEGRGRSGFRGR--GGYKGRNEDVGSQGPKNYTLKSDRENDNDKPK-ARVTVVPPPPPTEDGIFAHY	283
Ambystoma	----QTSFEGRRGGGFGGR--GGYKGRNEDVGSAGQGP--WKSDEGRENDKPAARVTVVPPPPPTEDGIFAHY	268
Xenopus	----SDTGGRRGGGSGGSGYGGYKGRNEEVGSGKSK--KKVTYIPPPPPDGEDNI FRQY	249
Danio	-----GRGGGFRGGFRDGGGDESGKRGFRGVTAD-----KLDQEGSENAGPKVYVPPPPPEESSIFSHY	223
Gallus	-----SPLRGSPPFAPGGGAVGPGVGLKGRSE-----EIDSGRGPKVTVVPPPPPEESSIFACY	210
O Motif		
Homo	QTGINFDKYDITLVEVSGHDAPPAILTFEEANLCQTLNNNIAGAGYTKLTPVCKYISIPILAGRDLMACQATGSGKTAAF	342
Mus	QTGINFDKYDITLVEVSGHDAPPAILTFEEANLCQTLNNNIAGAGYTKLTPVCKYISIPILAGRDLMACQATGSGKTAAF	341
Pleurodeles	QTGINFDKYDITLVDVSGINPPAILTFEEANLPETLTRNISKAGYVKLTPVCKYISIPILAKRDLMACQATGSGKTAAF	363
Ambystoma	QTGINFDKYDITLTVNTPGKPPAILTFEEANLPETLYNNISKAGYTKLTPVCKYISIPILARRDLMACQATGSGKTAAF	348
Xenopus	QSGINFDKYDEILDVDTGKDVPAITLTFEEANLCETLRNVARAGYVKLTPVCKYISIPILARRDLMACQATGSGKTAAF	329
Danio	ATGINFDKYDITLVDVSGSNPPKAITFEEAGLDCSLSKNVSKSGYVKLTPVCKHGIPIISAGRDLMACQATGSGKTAAF	303
Gallus	QSGINFDKYDECAVEMSGLDPPAPLFAFEANFAQTLRKNISKAGYVKLTPVCKHGIPIISAGRDLMACQATGSGKTAAF	290
Motif Ia		
Homo	LLPILAHMMMDGITASRFKELQEPECIIVAPRELINQIYLEARKFSFGTCVRAVVIYGGTQGHHSIRQIVQGCNILCAT	422
Mus	LLPILAHMMMDGITASRFKELQEPECIIVAPRELINQIYLEARKFSFGTCVRAVVIYGGTQGHHSIRQIVQGCNILCAT	421
Pleurodeles	LLPILAHMMMDGVAP-HSLDLQEPEAIIVAPRELINQIFLDARKFAYGTCTIKPVVYGGTQTFHSLRQIVQGCNILCAT	442
Ambystoma	LLPILAHMMMDQGIPT-PTSELQEPEIIVAPRELINQIFLDARKFAYGTCTIKPVVYGGTQTFHSLRQIVQGCNILCAT	427
Xenopus	LLPILSYMMNEGITASQYLQLEPEAIIVAPRELINQIFLDARKFAYGTCTIKPVVYGGTQTFHSLRQIVQGCNILCAT	408
Danio	LLPILQRFMTDGVAAKSEIQEPEAIIVAPRELINQIYLEARKFAYGTCTIKPVVYGGTQTFHSLRQIVQGCNILCAT	383
Gallus	LLPILQRFMTDGVAAKSEIQEPEAIIVAPRELINQIYLEARKFAYGTCTIKPVVYGGTQTFHSLRQIVQGCNILCAT	369
Motif Ib		
Homo	PGRLLDIIGKEKIGLKQIKYIIVLDEADRLMDMGFGPEMKKLISCPGMPSEQRQTLMSATPPEEIQRLAAEFLKSNLYF	502
Mus	PGRLLDIIGKEKIGLKQIKYIIVLDEADRLMDMGFGPEMKKLISCPGMPSEQRQTLMSATPPEEIQRLAAEFLKSNLYF	501
Pleurodeles	PGRLLDIIGKEKIGLKQIKYIIVLDEADRLMDMGFGPEMKKLISCPGMPSEQRQTLMSATPPEEIQRLAAEFLKSNLYF	522
Ambystoma	PGRLLDIIGKEKIGLKQIKYIIVLDEADRLMDMGFGPEMKKLISCPGMPSEQRQTLMSATPPEEIQRLAAEFLKSNLYF	507
Xenopus	PGRLLDIVSKEKIGLKQIKYIIVLDEADRLMDMGFAPBIEKLMTPKGMPTKEKRQTLMSATPPEEIRRLASNYLSEHLF	488
Danio	PGRLLDLIGRGKIGLKQIKYIIVLDEADRLMDMGFAPBIEKLMTPKGMPTKEKRQTLMSATPPEEIRRLASNYLSEHLF	463
Gallus	PGRLLDIIEKGKISLVEVKYIIVLDEADRLMDMGFAPBIEKLMTPKGMPTKEKRQTLMSATPPEEIRRLASNYLSEHLF	449
Motif Ic		
Homo	VAVGQVGGACRDVQQTIVLQVQFSKREKLVEILRNIGDERTMVFVETKKKADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREQA	582
Mus	VAVGQVGGACRDVQQTIVLQVQFSKREKLVEILRNIGDERTMVFVETKKKADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREQA	581
Pleurodeles	VVVGQVGGACSDVEQIIIPVQGHGKKDLVEILQGLGIERTMVFVETKKRA-----SIHGDRLQKEREQA	587
Ambystoma	VTVGQVGGACADVQKILEVDQYKDKLVEILQGLGKERTMVFVETKKMADYLLTLLCQENISATSIHGDRLQKEREQA	587
Xenopus	VVVGQVGGACSDVQQTIVLQVQFSKREKLVEILRNIGDERTMVFVETKKKADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREQA	568
Danio	LAVGVVGGACSDVEQIIIPVQGHGKKDLVEILQGLGIERTMVFVETKKRA-----SIHGDRLQKEREQA	543
Gallus	LVIGNTCGACSDVQQTIVLQVQFSKREKLVEILRNIGDERTMVFVETKKKADYLAFLCQENISATSIHGDREQREREQA	529
Motif Id		
Homo	LGDFRFGKCPVLVATSVAAAGLDIENVQHVINFDPSTIDEYVHRIGRTGRCGNTGRAISFFDL--ESDNHLAQLPVKVL	660
Mus	LGDFRFGKCPVLVATSVAAAGLDIENVQHVINFDPSTIDEYVHRIGRTGRCGNTGRAISFFDL--ESDNHLAQLPVKVL	659
Pleurodeles	LADFRFGKCNVLVATNVAAGLDIENVQHVINYDLSNIEEYVHRIGRTGRCGNVGKATFFFDTDNEDRTVARSLLKVL	667
Ambystoma	LADFRFGKCHVLVATNVAAGLDIENVQHVINYDLSNIEEYVHRIGRTGRCGNVGKATFFFDTDNEDRTVARSLLKVL	667
Xenopus	LWDFRTGKCTVLCTAVAAGLDIENVQHVINYDVPKEVDYVHRIGRTGRCGNTGKATSFNNV--QDDHVIARPLVKVL	646
Danio	LSDFRFGKCPVLVATSVAAAGLDIENVQHVINYDVPKEVDYVHRIGRTGRCGNTGKATSFNNV--QDDHVIARPLVKVL	621
Gallus	LRFDRSGKQIIVLAVTSVAAAGLDIENVQHVINFDPSTIDEYVHRIGRTGRCGNTGKATSFNNV--QDDHVIARPLVKVL	607
Motif Ie		
Homo	TDAQQDVPAWLEEEIAFSTYIP-GFSGSTRG-NVFASVDRK--GKSTLNTAGFSSS-----QAPNPVDESDES	724
Mus	SDAQQDVPAWLEEEIAFSTYIPGFSSTRG-NVFASVDRK--GKSTLNTAGFSSS-----QAPNPVDESDES	728
Pleurodeles	SDAQQEVPAWLEEEIAFSTYIPGFSSTRG-NVFASVDRK--GKSTLNTAGFSSS-----QAPNPVDESDES	727
Ambystoma	SDAQQEVPTWLEEMAYSIHGS--S--SRASFASVDRK--TSFNTGGYAQS-----SAFAADEASDES	724
Xenopus	SDAQQEVPAWLEEEIAFSTYIPGFSSTRG-NVFASVDRK--GKSTLNTAGFSSS-----QAPNPVDESDES	700
Danio	SGAQQVVPKLEEEIAFSTYIPGFSSTRG-NVFASVDRK--GKSTLNTAGFSSS-----QAPNPVDESDES	688
Gallus	SRTQEFQFGGMAVQRTNIV--ASTWCPKGLMQA--VAEWNPREMRMS-----YSETTFKSWE	662

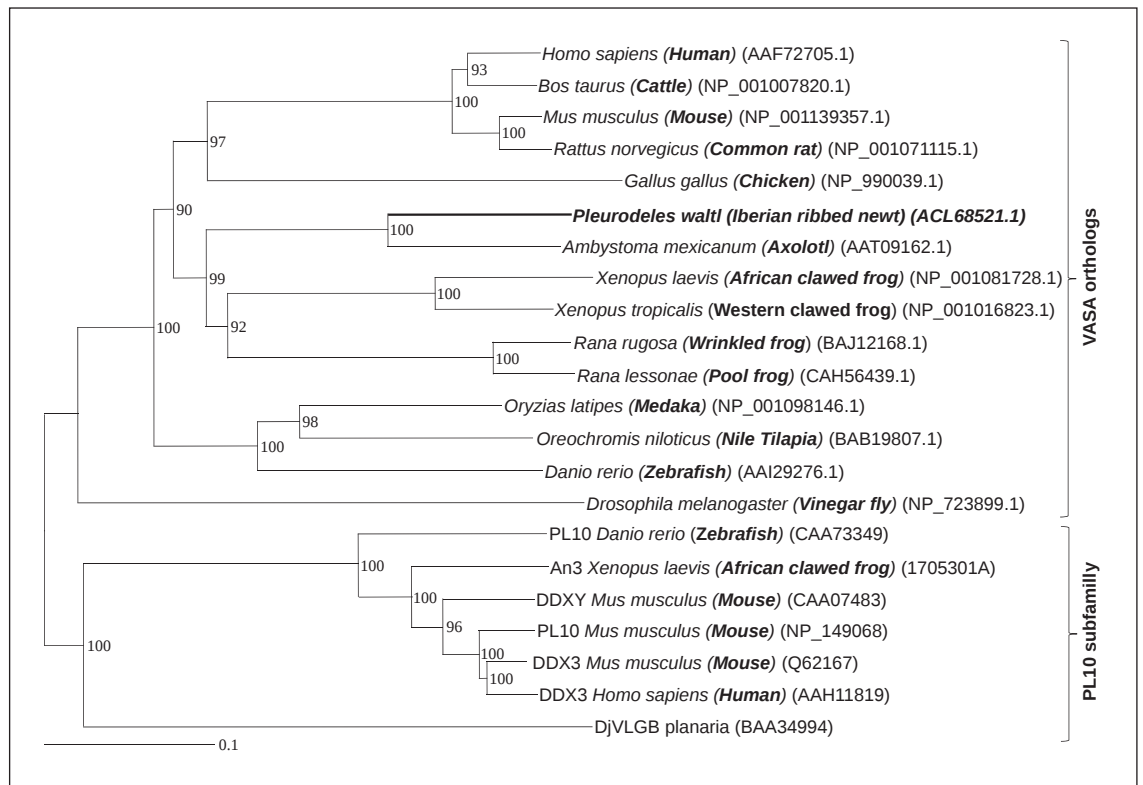


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree of VASA proteins from different species. This tree was created with the Phylowin program (observed distance, all sites, pairwise removal) [Galtier et al., 1996]. Then, we applied a bootstrap test of 500 replicates to check the robustness of the phylogram. The bootstrapping values, distance scale and GenBank accession numbers are given.

Effect of Busulfan on GCs

First, a rapid follow-up of GC loss in busulfan-treated larvae was performed by the RT-PCR analysis of PwVASA mRNA expression in the trunk of larvae (fig. 5A). In control ZW larvae, PwVASA mRNA expression was higher at stage 50 than at stage 39. In contrast, in busulfan-treated ZW larvae, PwVASA mRNA expression was lower at stage 50 than at stage 39. A decreased expression of PwVASA mRNA was also observed at stage 50 in busulfan-treated ZZ larvae (fig. 5A).

Then, GC numbers were determined by a microscope examination (fig. 5B). At stage 54, female larvae of progeny F were subjected to a comprehensive examination of all the sections of the 2 gonads which revealed 959 ± 204 GCs per gonad in controls ($n = 2$ larvae) and absolutely no GC in busulfan-treated individuals ($n = 3$ larvae). At the same stage, the number of GCs per gonad was 124 ± 14 in control ZZ gonads ($n = 3$) versus 3 ± 0 in busulfan-treated ZZ larvae ($n = 3$). At stage 54^{60d}, the number of GCs per gonad reached 308 ± 16 ($n = 3$) in control males

and 0 ± 0 ($n = 3$) in busulfan-treated males. Thus, GC counts confirmed the depletion of GC suspected from the RT-PCR analysis of VASA expression.

Effect of Busulfan on Gonad Differentiation

We also studied gonad differentiation at stages 54 and 54^{60d} (fig. 6). At stage 54, control ZW gonads displayed a nascent central cavity (the result of medulla regression) and the cortex contained numerous GCs easily identified among somatic cells due to their large size (22.52 ± 1.53 μm , $n = 10$) and their polylobular nucleus (fig. 6). In gonads of busulfan-treated ZW larvae at stage 54, despite the absence of GCs, gonads displayed an ovarian phenotype attested by the presence of the nascent central cavity (fig. 6). In control female larvae of stage 54^{60d}, the ovarian cavity was more advanced. The cortex contained an inner layer of somatic cells derived from the medulla, an outer layer corresponding to the coelomic epithelium and, between these 2 layers, numerous GCs, most of which were meiotic. In busulfan-treated larvae at the same stage, the

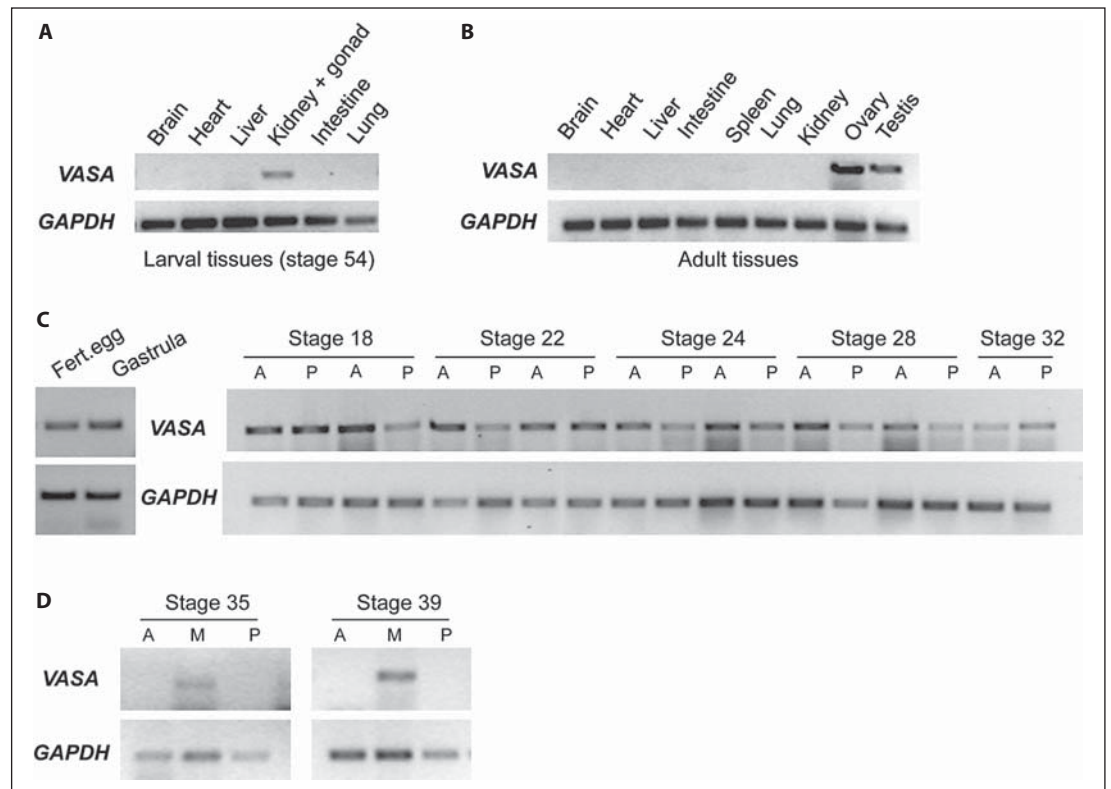
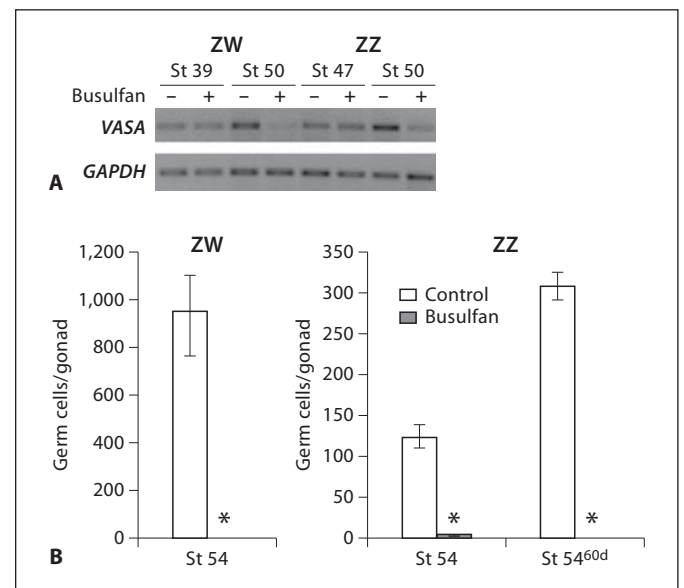


Fig. 4. RT-PCR analysis of VASA mRNA expression in embryos, larvae and adults of *P. waltl*. **A** Tissues were harvested from a larva at stage 54. **B** Tissues were harvested from males and females. **C** The fertilized egg (fert. egg) and gastrula were analyzed without dissection. Embryos from stages 18–32 were cut into 2 pieces: the anterior part (A) begins at the head and ends at the pronephros bud, whereas the posterior part (P) includes the pronephros bud and ends at the tailbud. Two embryos are shown for stages 18–28.

D Young larvae (stages 35–39) were dissected into 3 pieces: the anterior part from the head to the gillbud (A), medial part (M) from gillbud to anus, posterior part (P) from the anus to the end of the tail. In all cases, total RNA was reverse transcribed and amplification of VASA was performed as described in Materials and Methods. GAPDH amplification served as control for relative RNA amounts.

Fig. 5. VASA expression and GC numbers in control and busulfan-treated larvae. **A** VASA mRNA expression was studied using RT-PCR as described in Materials and Methods from the trunks of control (–) and busulfan-treated (+) female (ZW) and male (ZZ) larvae at the indicated stages. GAPDH amplification served as control for relative RNA amounts. **B** GC number per gonad was calculated by examination of all the sections of the left and right gonad. Since 1 GC was present on 3 adjacent sections, the total number of counted GCs was divided by 3 to obtain the number of GCs per gonad. Vertical bars indicate the standard error of the mean. Asterisks indicate significant difference from the control at the same stage ($p < 0.05$).



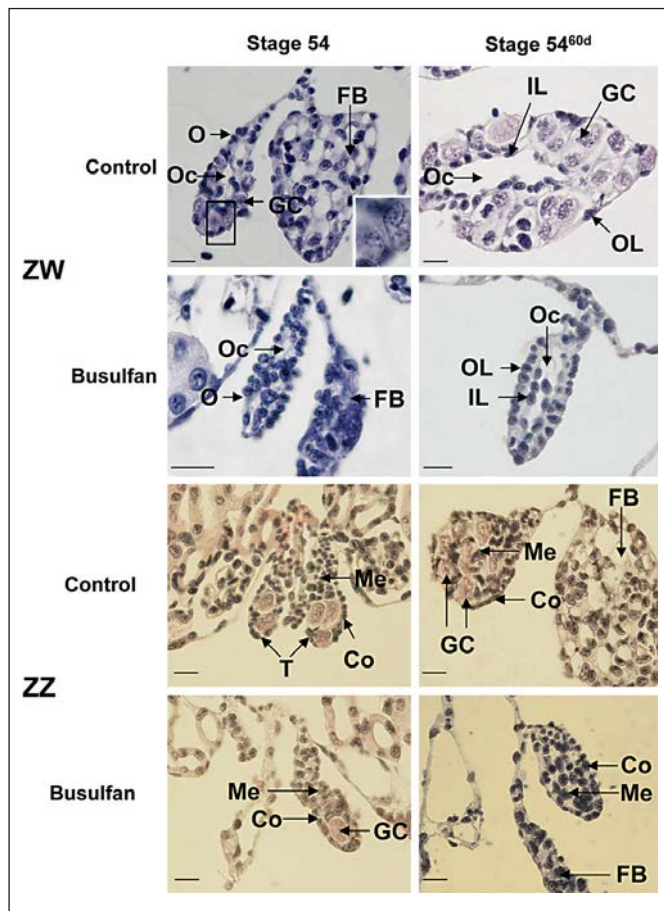


Fig. 6. Histology of gonads from control and busulfan-treated larvae. In female larvae (ZW), at stage 54, both control and busulfan-treated individuals possess a fat body and an ovary identified by the central cavity. In the ovary of control females, GCs are recognized by their large size and their polylobular nucleus at stage 54, whereas at stage 54^{60d}, most of them enter meiosis and acquire a round nucleus with condensed chromatin. In the ovary of busulfan-treated larvae, there are no GCs at stages 54 and 54^{60d} and at the latter stage, 2 layers of somatic cells are clearly distinguished. In male larvae (ZZ), from stage 54 to stage 54^{60d}, the control testis contains increasing numbers of GCs recognized by their large size and their polylobular nucleus. GCs are present only in the medulla, whereas the cortex is very thin. In the testis of busulfan-treated males, the number of GCs is very low at stage 54 and no GCs are observed at stage 54^{60d}. A cortex and a medulla can be distinguished at both stages. Co: cortex; FB: fat body; GC: germ cells; IL: inner layer; Me: medulla; O: ovary; Oc: ovarian cavity; OL: outer layer; T: testis. Bars represent 25 μ m.

2 layers of somatic cells were very clearly distinguished in the ovarian cortex, due to the absence of GCs (fig. 6). At stages 54 and 54^{60d}, ZZ gonads displayed a testis phenotype easily recognized by the presence of a thin cortex and a central medulla devoid of any cavity (fig. 6).

In order to confirm the phenotype of the gonads diagnosed in our histological study, we performed a real-time PCR analysis of the aromatase mRNA level (fig. 7). At stage 54^{60d}, the ratio aromatase/GAPDH in GM complexes of busulfan-treated ZW larvae was identical to those measured in control females whereas it was significantly (4.5-fold) higher than in control males. Moreover, in busulfan-treated ZW larvae the presence of a differentiating Müllerian duct identical to those of control females was in agreement with the female phenotype of the gonad (data not shown). In GM complexes of busulfan-treated ZZ larvae of the same stage, the aromatase mRNA level was as low as in control male larvae and it was significantly lower than in female larvae (fig. 7). Besides, in busulfan-treated ZZ larvae the differentiation of Müllerian ducts was not detected (data not shown).

Since the complete loss of GC occurred slightly later than in female larvae (stage 54^{60d} instead of stage 54), males were also studied after metamorphosis, at the juvenile stage. The testis of busulfan-treated males was smaller than that of controls but it displayed the same regions: a thin anterior part associated with the lung and a large posterior part which seems to differentiate as the first testis lobe (fig. 8). In control testis, GCs with polylobular nuclei were present in the anterior part whereas spermatogenesis was going on in the first testis lobe containing not only cysts within lobules but also efferent ducts. In busulfan-treated males, there were no GC but the testis phenotype could be recognized by the presence of ramifying efferent ducts and lobules (fig. 8).

Discussion

In the present study, the sequence we cloned encodes a putative protein which possesses the 8 conserved motifs that characterize the DEAD-box ATP-dependent RNA helicases. The amino acid sequence also showed the presence of 3 other features of this family: the upstream Q motif, a conserved GG between motifs Ia and Ib and a conserved QxxR between motifs IV and V. The protein shows the highest identity with *A. mexicanum* VASA [Bachvarova et al., 2004]. Comparative phylogenetic data suggests that the VASA gene family originated from duplication in a PL10-related DEAD-box gene early in metazoan evolution [Mochizuki et al., 2001]. Whereas animals have both VASA and PL10 genes, plants and fungi have only PL10 genes and lack VASA genes. Among the VASA family, proteins of the PL10 subfamily possess conserved residues forming 2 hydrophobic pockets on the non-

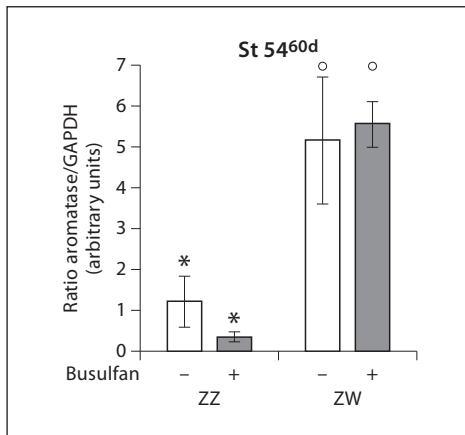


Fig. 7. Aromatase expression status in control and busulfan-treated larvae at stage 54^{60d}. Results of quantitative real-time RT-PCR analyses performed on GM complexes of control female larvae (ZW), control male larvae (ZZ), busulfan-treated female larvae (ZW + busulfan) and busulfan-treated male larvae (ZZ + busulfan). For each group, the results are expressed as mean $\pm$ s.e.m. of 3 measurements performed on 3 different larvae. Asterisks indicate significant difference from control females ($p < 0.01$). Circles indicate significant difference from control males ($p < 0.01$).

ATPase side of the N-terminal RecA-like domain. For instance, in the planaria *Dugesia japonica* PL10 homolog DjVLGB such residues are Tyr261 and Phe335 [Kurimoto et al., 2005]. In PwVASA these residues are not conserved and are not replaced by aromatic amino acids. Moreover, our phylogenetic analysis shows that PwVASA segregates with VASA orthologs rather than with members of the PL10 subfamily. These data prompted us to conclude that we have cloned a VASA ortholog in *P. waltl* rather than a VASA-related gene.

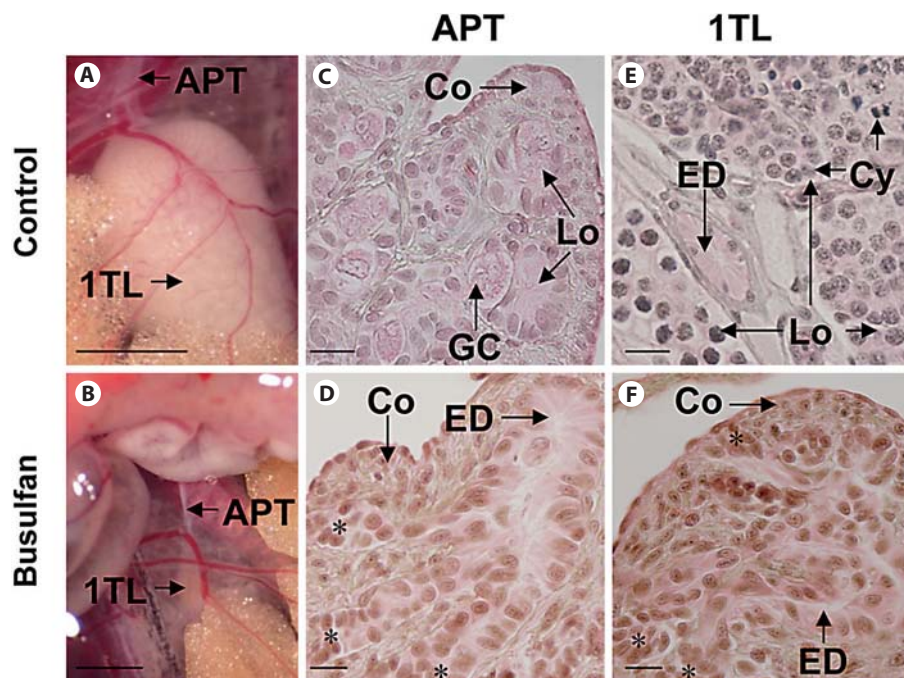
During the course of *P. waltl* development, VASA expression was only found in GC-containing locations from stage 35 where hatching takes place. A very similar situation was described in the urodele amphibian *A. mexicanum* in which RT-PCR analyses revealed the presence of VASA mRNA from cleavage stage embryos to stage 40, but it is widespread in dissected parts of the embryos and gonad-specific expression could not be detected from stage 8–35 by in situ hybridization [Bachvarova et al., 2004]. In invertebrates, VASA expression is not restricted exclusively to GCs but occurs also in multipotent cell types. In cnidarians, for instance, the multipotent interstitial cells do not only contribute to the germ line, but also to somatic cell types such as nematocytes and gland cells [Gustafson and Wessel, 2010]. In flatworms that possess remarkable regenerative potencies due to their

pool of multipotent stem cells (neoblasts), *Vasa* is expressed not only in the gonads but also in the neoblast stem cells [Gustafson and Wessel, 2010]. However, in vertebrates VASA expression outside of the germline has never been described. Although *P. waltl* displays high regenerative capabilities, the non-germline expression of VASA before stage 35 was probably the result of maternal mRNAs that persist after fertilization up to this stage rather than the result of the presence of stem cells. In larvae and adults, we observed that the PwVASA homolog expression was restricted to the gonads. Hence, in *P. waltl*, VASA mRNA could be used as a specific GC marker after hatching. In contrast to tilapia and zebrafish, in which sex-linked VASA splice variants have been described, we never observed such variants in *P. waltl* [Kobayashi et al., 2002; Krøvel and Olsen, 2004].

When *P. waltl* larvae were treated with busulfan (among the 2 doses we tested), the dose of 50 $\mu\text{g/ml}$ was deleterious: growth was delayed and most larvae died before stage 54. In contrast, a dose of 25 $\mu\text{g/ml}$ was well-tolerated. It is interesting to compare these data with those obtained in fish in which busulfan can also be added to the rearing water. In medaka, the eggs were exposed to various concentrations of busulfan during embryonic stages 17–37 [Shinomiya et al., 2001]. At 25 $\mu\text{g/ml}$, the hatchability decreased slightly but the hatched fry developed normally. At concentrations $>25 \mu\text{g/ml}$, the hatchability was significantly reduced and at 50 $\mu\text{g/ml}$ none of the embryos hatched. This result illustrates that the toxicity of the alkylating agent is very similar to what we found. At concentrations of 25 $\mu\text{g/ml}$ and higher, fry with a markedly low number of GCs were observed.

When we used RT-PCR analysis of the VASA transcript to monitor the degree of gonad sterility, we observed that although busulfan was applied at hatching (stage 35), the loss of GCs did not occur immediately. Indeed, the decrease of VASA expression was detected at stage 50 in both females and males. The loss of GCs suggested by the decrease of VASA mRNA content was confirmed by the microscope examination of the gonads. The total loss of GCs seemed to appear slightly later in males than in females (stage 54^{60d} vs. stage 54). This difference in the timing of GC loss between males and females could be related to differences in GC proliferation. Indeed, GC proliferation has been studied in *P. waltl* larvae and 3 periods have been defined: the P_0 period during which GCs do not proliferate, the P_1 period characterized by a moderate proliferation of GCs which is identical in ZZ and ZW larvae (it ends at stage 50) and the P_2 period during which there is a higher level of GC proliferation in

Fig. 8. Morphology and histology of gonads of control and busulfan-treated males at the juvenile stage. The testis of busulfan-treated males is smaller than that of controls (compare **A** and **B**) but it displays the 2 typical regions: a thin anterior part (APT) that is associated with the lung and a large posterior part which differentiates as the first testis lobe (1TL). In contrast to controls (**C**, **E**), both regions (**D**, **F**) are devoid of GCs, efferent ducts are present with ramifications ending by groups of somatic cells corresponding to lobules (asterisks). Like in the control testis, the cortex is larger in the APT than in the 1TL (compare **D** and **F**). In the control testis, lobules of the APT contain GCs with polylobular nucleus, whereas lobules of the 1TL contain cysts with meiotic GCs at different stages of spermatogenesis. Co: cortex; Cy: cyst; ED: efferent duct; GC: germ cell; Lo: lobule. Bars represent 2 mm in **A**, **B** and 25 μ m in **C–F**.



ZW than in ZZ larvae, leading to a higher number of GCs in female larvae (634 vs. 489 per animal at stage 53) [Dournon et al., 1990]. Besides, GC counts in parabiosis of *P. waltl* indicated that in ZZ larvae GC numbers were identical at stages 53 and 54 but that they increased at stage 54^{60d} (118 vs. 205 GCs per gonad) [Dumond et al., 2008b]. Then, the periods of high proliferation seem to be correlated with the timing of complete GC loss in both sexes. However, a detailed analysis of GC numbers between stage 50 and 54 should be performed to confirm this observation.

In ZW individuals exposed to busulfan, despite the absence of GCs, we observed a normal ovary differentiation attested at stage 54 by the presence of the typical central cavity due to medulla regression. At stage 54^{60d}, 2 layers of somatic cells were clearly observed in the wall of the ovary: an outer layer corresponding to the coelomic epithelium and an inner layer corresponding to the residual medulla. In the medaka *Oryzias latipes*, the ovary of busulfan-treated individuals displayed a well-developed ovarian cavity [Shinomiya et al., 2001]. Similarly, in the red-eared turtle *Trachemys scripta*, ovaries from busulfan-treated animals lacked GCs, but the morphological landmarks of the ovary were not altered: the cortical domain was present and lacunae appeared in the medulla [DiNapoli and Capel, 2007]. Although we did not observe follicles, the analysis of aromatase expression, which was

similar to those of control ZW larvae, indicated that estrogen-producing cells are present. The values of the aromatase/*GAPDH* ratios were similar to the values usually observed in *P. waltl* GM samples at this period of development [Kuntz et al., 2004; Ko et al., 2008]. Moreover, the differentiation of Müllerian ducts, that is known to be estrogen-dependent, had started. Taken together, these results indicate that, except for the absence of follicles, the initial steps of ovary differentiation are normal in the absence of GCs (that disappear at an earlier stage than in ZZ larvae). It might be interesting to complete the present study by an analysis of the ovary of busulfan-treated *P. waltl* at adulthood. Indeed, in mammals, in the absence of GCs, the XX gonad fails to form follicles and undergoes ovarian degeneration often associated with partial sex reversal, and expression of testis markers [Guigon et al., 2005]. Adult female-to-male sex reversal also occurs in zebrafish in the absence of GCs [Slanchev et al., 2005]. Moreover, in the frog *R. brevipoda*, although the sex ratio of animals derived from UV-irradiated eggs (and GC depleted) was normal just after metamorphosis, a high male/female ratio (25/8) was observed at the age of sexual maturity (2 years) [Shirane, 1982].

In ZZ individuals exposed to busulfan, despite the absence of GCs, we also observed normal testis differentiation attested at stage 54^{60d} by the presence of a thin cortex and a medulla. Our RT-PCR studies showed that in GM

complexes, aromatase mRNA levels were identical to those measured in control male larvae suggesting a male status for the somatic cells of the GC-depleted ZZ gonad. The analysis of testis markers could have been useful. Unfortunately, in *P. waltl*, no male-specific markers are available at this stage (54^{60d}) for RT-PCR studies of GM samples. Indeed, in contrast to aromatase, whose expression is gonad-specific, SOX9 is also expressed in the mesonephros and this masks its differential expression (testis-enriched) at stage 54^{60d} [Dumond et al., 2011]. One might also suggest the study of *DMRT1*. However, in *P. waltl*, it is a reliable testis-specific marker only after metamorphosis [Dumond et al., 2008b; our unpublished results]. Despite the absence of data about testis markers at stage 54^{60d}, the histological study of the gonad at the juvenile stage definitely confirmed the male phenotype since efferent ducts and lobules were present. Due to the lack of GCs, the efferent ducts and their ramifications appeared much more clearly than in control testes. However, because GCs were ablated rather late following our busulfan treatments (stage 54^{60d} in males), we cannot exclude the possibility that the remaining GCs (35 per gonad at stage 50) exert an effect on the initial steps of gonad differentiation.

In conclusion, this study describes for the first time the cloning of a VASA ortholog in the urodele amphibian *P. waltl* and the RT-PCR analysis of its expression pattern during development. This marker is a useful tool for the survey of GC depletion following treatment with busulfan. This compound efficiently induces GC depletion which does not alter ovary or testis differentiation in *P. waltl*. However, it should be kept in mind that GCs do not disappear completely before gonad differentiation, at least in males, and that they could, however, play a role in this experimental model. In females, GC depletion does not induce sex reversal, but further experiments should be performed to determine if such an event could occur at later stages.

Acknowledgments

We would like to thank M. Chillet, L. Moitrier and A. Kleinclauss for animal rearing. We also thank M. Chillet for her excellent work with the histology. We are also grateful to Professor Simon Thornton for English editing. This work was performed using materials obtained with grants from the Ligue Contre le Cancer, of the Association pour la Recherche sur le Cancer, of the Conseil Régional de Lorraine, of the FEDER and of the Université Henri Poincaré. I.A.-A. was recipient of a Syrian government fellowship (decision 1033).

References

- Aubry R: Nouveaux essais de stérilisation totale des gonades de *Rana temporaria* par action des rayons ultraviolets sur le pôle inférieur de l'oeuf fécondé. C R Acad Sci III 236:1101–1102 (1953).
- Bachvarova RF, Masi T, Drum M, Parker N, Mason K, et al: Gene expression in the axolotl germ line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axot-4*, and *Axkit*. Dev Dyn 231:871–880 (2004).
- Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dournon C: Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. Gen Comp Endocrinol 99:100–107 (1995).
- Chuma S, Nakatsuji N: Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. Dev Biol 229:468–479 (2001).
- DiNapoli L, Capel B: Germ cell depletion does not alter the morphogenesis of the fetal testis or ovary in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*). J Exp Zool B Mol Dev Evol 308:236–241 (2007).
- Dournon C, Collenot A, Lauthier M: Sex-linked peptidase-1 patterns in *Pleurodeles waltlii Michah* (Urodele Amphibian): genetic evidence for a new codominant allele on the W sex chromosome and identification of ZZ, ZW and WW sexual genotypes. Reprod Nutr Dev 28:979–987 (1988).
- Dournon C, Durand D, Demassieux C, Lesimple M: Differential germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl*: controls by sexual genotype and by thermal epigenetic factor before differentiation of sexual phenotype of gonads. Int J Dev Biol 34:365–375 (1990).
- Dumond H, Kuntz S, Chesnel A, Ko CI, Walacides A, et al: Sexual development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Sex Dev 2:104–114 (2008a).
- Dumond H, Maufruid JP, Ko CI, Chardard D, Chesnel A, et al: Freemartin in the amphibian *Pleurodeles waltl*: parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. Mol Reprod Dev 75:439–449 (2008b).
- Dumond H, Al-Asaad I, Chesnel A, Chardard D, Boizet-Bonhoure B, et al: Temporal and spatial SOX9 expression patterns in the course of gonad development of the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. J Exp Zool B Mol Dev Evol 316B:199–211 (2011).
- Ewen KA, Koopman P: Mouse germ cell development: from specification to sex determination. Mol Cell Endocrinol 323:76–93 (2010).
- Extavour CG, Akam M: Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. Development 130:5869–5884 (2003).
- Flament S, Dumond H, Chardard D, Chesnel A: Lifelong testicular differentiation in *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Caudata). Reprod Biol Endocrinol 7:21 (2009).
- Gallien L, Durocher M: Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl*. Bull Biol Fr Belg 91:97–114 (1957).
- Galtier N, Gouy M, Gautier C: SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Comput Appl Biosci 12:543–548 (1996).
- Guerquin MJ, Duquenne C, Coffigny H, Rouiller-Fabre V, Lambrot R, et al: Sex-specific differences in fetal germ cell apoptosis induced by ionizing radiation. Hum Reprod 24:670–678 (2010).
- Guigon CJ, Coudouel N, Mazaud-Guittot S, Forest MG, Magre S: Follicular cells acquire Sertoli cell characteristics after oocyte loss. Endocrinology 146:2992–3004 (2005).

- Guigon CJ, Magre S: Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* 74:450–458 (2006).
- Gustafson EA, Wessel GM: Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays* 32:626–637 (2010).
- Hay B, Jan LY, Jan YN: A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55:577–587 (1988).
- Ko CI, Chesnel A, Mazerbourg S, Kuntz S, Flament S, et al: Female-enriched expression of ERalpha during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Gen Comp Endocrinol* 156:234–245 (2008).
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y: Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mech Dev* 111:167–171 (2002).
- Krøvel AV, Olsen LC: Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development. *Dev Biol* 271:190–197 (2004).
- Kuntz S, Chesnel A, Duterque-Coquillaud M, Grillier-Vuissoz I, Callier M, et al: Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:89–100 (2003a).
- Kuntz S, Chardard D, Chesnel A, Grillier-Vuissoz I, Flament S: Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenet Genome Res* 101:283–288 (2003b).
- Kuntz S, Chesnel A, Flament S, Chardard D: Cerebral and gonadal aromatase expressions are differently affected during sex differentiation of *Pleurodeles waltl*. *J Mol Endocrinol* 33:717–727 (2004).
- Kurimoto K, Muto Y, Obayashi N, Terada T, Shirouzu M, et al: Crystal structure of the N-terminal RecA-like domain of a DEAD-box RNA helicase, the *Dugesia japonica* vasa-like gene B protein. *J Struct Biol* 150:58–68 (2005).
- Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, et al: Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16958–16963 (2007).
- Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, et al: Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 143:4775–4787 (2002).
- McCarrey JR, Abbott UK: Chick gonad differentiation following excision of primordial germ cells. *Dev Biol* 66:256–265 (1978).
- McCarrey JR, Abbott UK: Functional differentiation of chick gonads following depletion of primordial germ cells. *J Embryol Exp Morphol* 68:161–174 (1982).
- McLaren A, Southee D: Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol* 187:107–113 (1997).
- McLaren A: Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *Bioessays* 13:151–156 (1991).
- Mochizuki K, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T: Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. *Dev Genes Evol* 211:299–308 (2001).
- Raz E: The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol* 1:1017.1–1017.6 (2000).
- Shinomiya A, Hamaguchi S, Shibata N: Sexual differentiation of germ cell deficient gonads in the medaka, *Oryzias latipes*. *J Exp Zool* 290:402–410 (2001).
- Shirane T: Gonadal differentiation in frogs, *Rana japonica* and *R. brevipoda*, raised from UV irradiated eggs. *J Exp Zool* 223:165–173 (1982).
- Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Méndez G, Raz E: Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4074–4079 (2005).
- Styhler S, Nakamura A, Swan A, Suter B, Lasko P: vasa is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development* 125:1569–1578 (1998).
- Upadhyay S, Zamboni L: Ectopic germ cells. A natural model for the study of germ cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6584–6588 (1982).

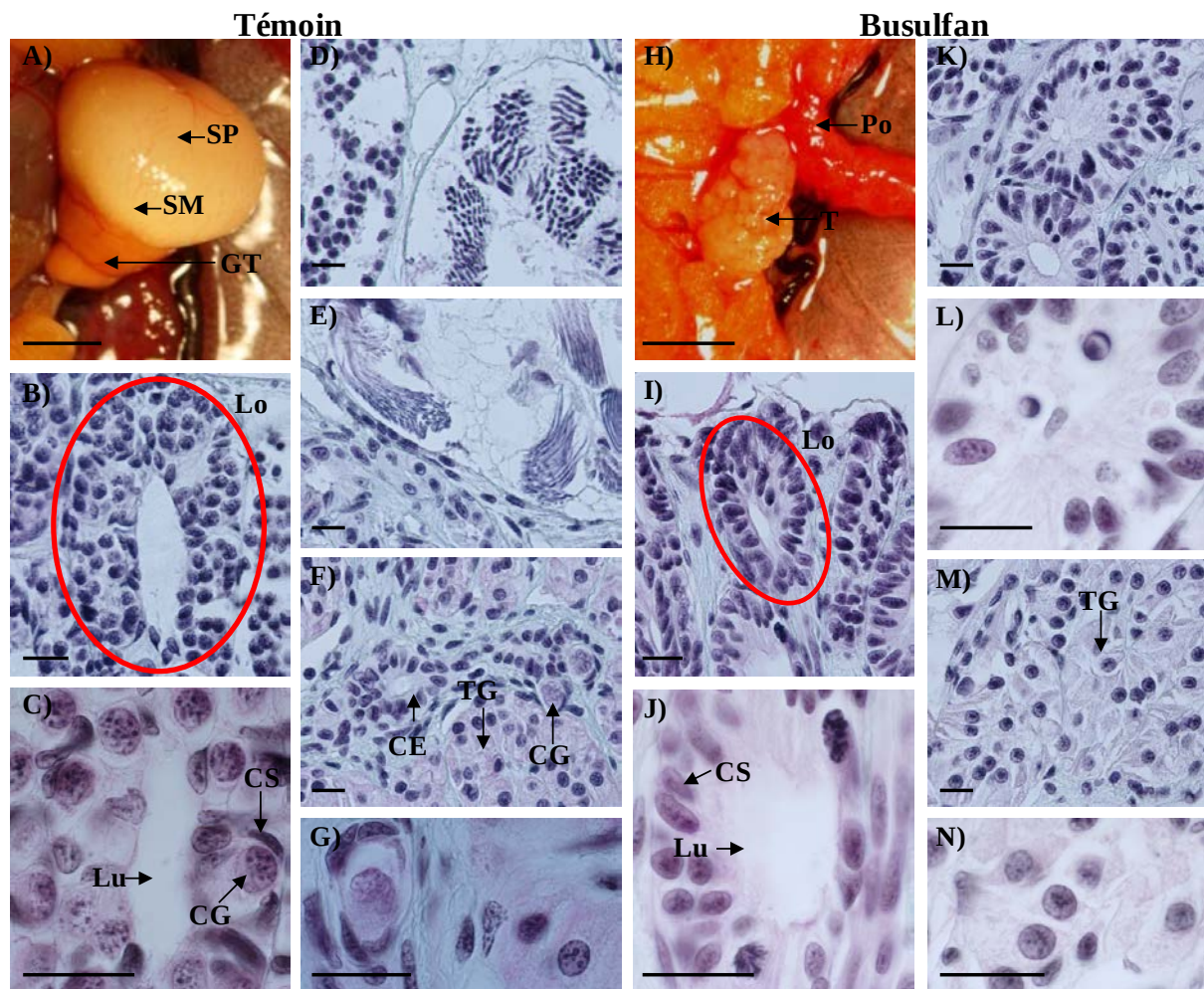


Figure 59 : Analyses histologique des gonades adultes d'un témoin et d'un individu traité au Bu.

A, H) Morphologie d'un testicule d'un témoin et d'un testicule d'un animal traité au Bu. Chez les mâles témoins, on observe trois parties correspondant aux régions avec spermatogenèse précoce (SP), spermatozoïdes matures (SM) et tissu glandulaire (TG), tandis que chez les mâles traités au Bu, les testicules ne présentent pas cette régionalisation. **B-G)** Coupes histologiques dans les différentes régions du testicule témoin. La région grise immature comporte des gros lobules (Lo) contenant des spermatogonies (**B**), des lobules contenant des spermatocytes entourant une grande lumière (Lu) (**C**) et des lobules avec des spermatides (**D**). La région blanche mûre est pleine de spermatozoïdes (**E**). La région du tissu glandulaire (TG) contient des CG à noyaux polylobés présentes notamment le long des canaux efférents (CE) (**F,G**). **I-N)** Coupes histologiques dans les régions de testicule traité au Bu. Dans la région antérieure, bien qu'il n'y ait pas de CG en spermatogenèse, la gonade contient des lobules typiques avec des cellules somatiques (CS) entourant une lumière centrale (Lu) (**I-L**). Vers la région postérieure, la taille de ces cellules somatiques augmente alors que la lumière diminue pour qu'elles deviennent glandulaires (**M,N**). Poumon (Po). Barres = 3 mm pour (A, H), 25 µm pour le reste.

II.2) Résultats supplémentaires concernant l'effet de l'absence de CG chez les Pleurodèles adultes

II.2.1) D'un point de vue morphologique et histologique

Chez les adultes témoins, la partie antérieure du testicule attachée au poumon se réduit au cours du temps. Cependant, les CG à noyaux polylobés sont toujours présentes. La partie postérieure du testicule présentant le premier lobe testiculaire constitue trois régions différentes : une région grise dite immature située dans la partie antérieure du lobe contenant des spermatogonies, des spermatocytes et des spermatides, une région blanche dite mûre localisée dans la partie postérieure du lobe et qui renferme des cystes pleins uniquement de spermatozoïdes, et une région orange formant le tissu glandulaire contenant des cellules lobulaires modifiées qui apparaissent après l'évacuation des spermatozoïdes. Dans ce tissu glandulaire, les CG à noyaux polylobés sont présentes notamment le long des canaux efférents (Figure 59A-G).

Chez les ZZ traités au Bu, l'examen morphologique des testicules à l'âge adulte n'a pas révélé les trois régions avec la spermatogenèse précoce, les spermatozoïdes matures ainsi que le tissu glandulaire. Ce testicule, d'une part, est plus petit que le contrôle avec une surface rugueuse, et d'autre part, il ne possède aucune CG en spermatogenèse (spermatogonies, spermatocytes, spermatides ou spermatozoïdes), et aucune CG résiduelle (Figure 59H-N). Cependant, malgré l'absence de CG, cette gonade contient des lobules typiques avec des cellules somatiques entourant une lumière centrale. La taille de ces cellules somatiques augmente alors que la lumière diminue pour qu'elles deviennent glandulaires.

II.2.2) Etude moléculaire

Nous avons également étudié les marqueurs moléculaires par RT-PCR dans le testicule adulte (Figure 60). Chez les mâles témoins, les testicules ont été séparés en trois parties correspondant aux régions avec la spermatogenèse précoce (SP), les spermatozoïdes matures (SM) et le tissu glandulaire (TG), tandis que chez les mâles traités au Bu, les testicules ont été séparés en deux parties ; antérieure (A) et postérieure (P). Dans le testicule contrôle, nous avons détecté l'ARNm de *vasa* dans la région de la spermatogenèse précoce. Un profil d'expression similaire a été observé pour la recombinaise *dmc1*, un marqueur de la méiose. L'état stérile des testicules traités au Bu a été confirmé par l'absence de l'ARNm des deux

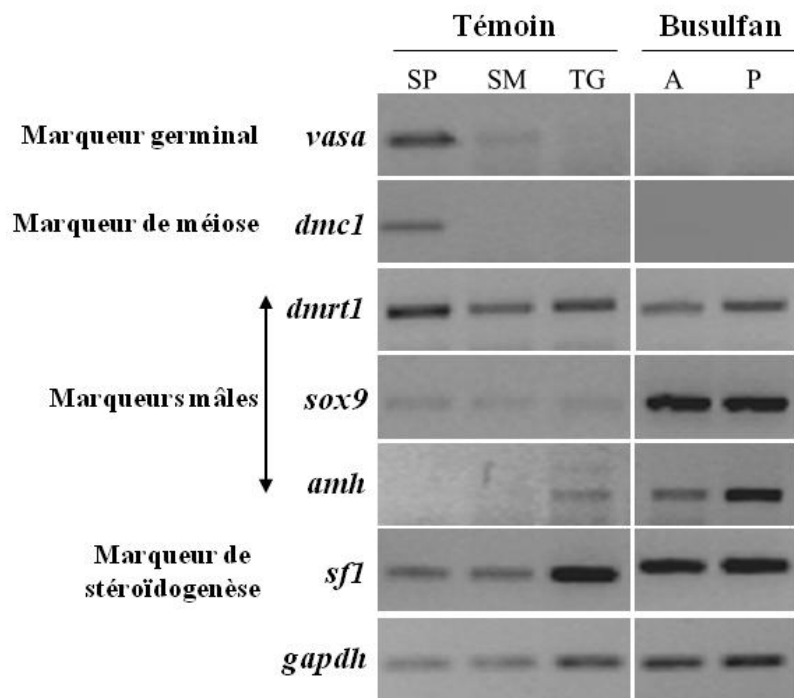


Figure 60 : Analyse moléculaire des gonades adultes d'un témoin et d'un individu traité au Bu. Plusieurs marqueurs moléculaires ont été utilisés pour ces analyses ; *vasa* comme marqueur germinal, *dmc1* comme marqueur de méiose, *dmrt1*, *sox9*, et *amh* comme marqueurs de la différenciation testiculaire et *sf1* comme marqueur de stéroïdogénèse. *gapdh* est le gène de référence. Dans le testicule témoin, les ARNm de *vasa* et *dmc1* ont été détectés dans la région de la spermatogenèse précoce. L'état stérile des testicules traités au Bu a été confirmé par l'absence de l'ARNm de ces deux marqueurs dans les deux parties de la gonade. Le niveau de l'ARNm de *dmrt1* est similaire chez le mâle témoin et le mâle traité. Cependant, les niveaux des ARNm *sox9*, *amh* et *sf1* sont plus élevés dans le testicule traité que dans un testicule témoin.

marqueurs *vasa* et *dmc1* dans les deux parties de la gonade. Le niveau de l'ARNm du *dmrt1*, un marqueur testiculaire chez les adultes, est similaire chez les mâles témoins et traités. Cependant, les niveaux des ARNm *sox9*, *amh* et *sf1* sont plus élevés dans le testicule traité que dans un testicule témoin (Figure 60).

II.2.3) Effet de l'absence de CG sur la prolifération cellulaire dans les gonades

Par ailleurs, afin de savoir si les CG jouent un rôle sur la prolifération des cellules somatiques du testicule adulte, nous avons réalisé une immunohistochimie en utilisant l'anti-PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), dirigé contre un antigène exprimé fortement dans les cellules en prolifération. Nous avons observé un marquage intense au niveau de cellules somatiques lobulaires dans la partie antérieure des testicules traités ainsi que les testicules témoins, suggérant que la présence des CG n'est pas nécessaire pour la prolifération des cellules somatiques (Figure 61). Sur ces coupes nous avons aussi appliqué l'anti-AMH de poulet. Nous avons observé que les cellules marquées par l'anti-PCNA n'étaient pas marquées par l'anti-AMH et que des cellules marquées par l'anti-AMH entouraient ces zones (Figure 61).

L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que l'absence de CG n'affecte pas la différenciation testiculaire chez le pleurodèle.

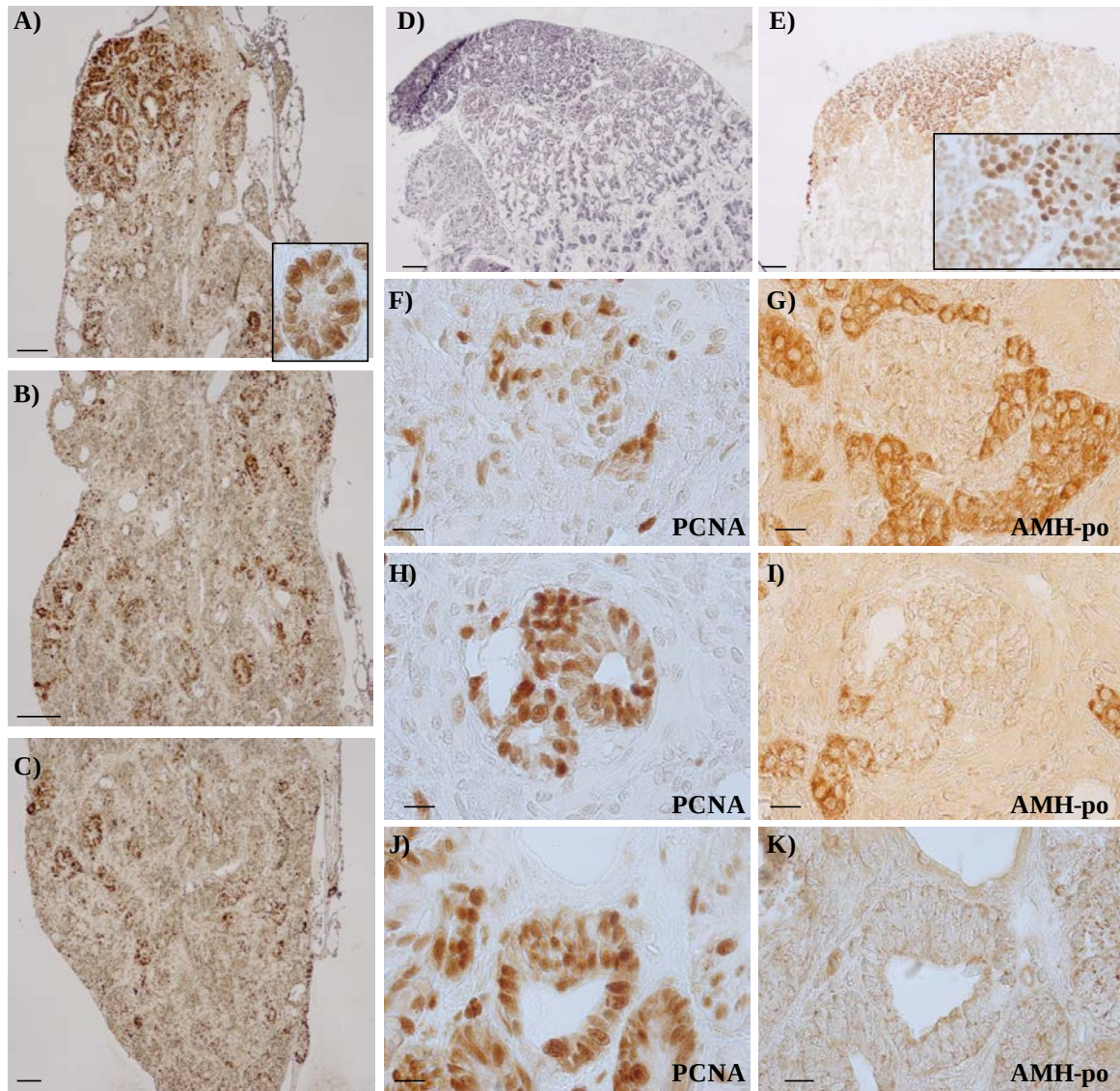


Figure 61 : La prolifération cellulaire dans le testicule de pleurodèle dépourvu de CG.

A-C) Parties antérieure, moyenne et postérieure du testicule d'un animal traité au Bu marqué par l'anti-PCNA. **D,E)** La partie antérieure du testicule témoin colorée par l'hématoxyline-éosine (D) et marquée par l'anti-PCNA (E). Un marquage intense au niveau des cellules somatiques lobulaires dans les parties antérieures des testicules traités et témoins a été observé (agrandissements montrés dans les cadres en (A) et (E), respectivement). **F, H, J)** Coupes des parties antérieure, moyenne et postérieure du testicule d'un pleurodèle traité au Bu, marquées par l'anti-PCNA. **G, I, K)** Coupes des parties antérieure, moyenne et postérieure du testicule d'un pleurodèle traité au Bu, marquées par l'anti-AMH de poulet (AMH-po). Les cellules marquées par l'anti-PCNA ne sont pas marquées par l'anti-AMH et les cellules marquées par l'anti-AMH entourent ces zones. Barres = 100 μm pour (A-E), et 25 μm pour les grossissements et (F-K).

DISCUSSION GENERALE

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans la thématique générale de la physiologie comparée de la reproduction, dans le cadre d'une meilleure compréhension du processus de la différenciation testiculaire chez l'amphibien urodèle *Pleurodeles waltl*. L'objectif était de caractériser l'expression de deux gènes connus comme des marqueurs de la différenciation mâle chez les vertébrés, *sox9* et *amh*, afin de comprendre ce processus chez le pleurodèle lors d'un développement gonadique normal, lors d'une inversion sexuelle masculinisante induite par la température ou bien féminisante induite par les hormones stéroïdes, et enfin lors de l'absence de CG.

I. Sox9 est-il un bon marqueur de la différenciation testiculaire chez le pleurodèle ?

Le facteur de transcription *sox9*, dont l'implication dans la différenciation testiculaire est bien documentée chez tous les vertébrés examinés (da Silva *et al.*, 1996; Pask *et al.*, 2002; Kent *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2005; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Shoemaker *et al.*, 2007; Spotila *et al.*, 1998; Moreno-Mendoza *et al.*, 1999; Torres Maldonado *et al.*, 2002; Western *et al.*, 1999b), a été isolé et analysé chez le pleurodèle. Chez les amphibiens, les données concernant l'expression de *sox9* sont documentées chez les anoures (Takase *et al.*, 2000; Osawa *et al.*, 2005; Abramyan *et al.*, 2009; El Jamil *et al.*, 2008), mais aucune donnée n'est disponible chez les urodèles.

Chez le pleurodèle, les transcrits de *sox9* sont détectés par RT-PCR semi-quantitative dans les complexes GM mâles et femelles dès le stade 42, c'est-à-dire bien avant la différenciation gonadique qui se détecte en histologie au stade 53. Cependant, ces analyses n'ont révélé aucune différence significative de la quantité d'ARNm de *sox9* entre les complexes GM des larves ZZ et ZW, même lorsque les analyses ont été faites au stade 54+60j où la différenciation gonadique est bien avancée. Cela est probablement dû à l'expression importante de *sox9* dans le mésonéphros qui pourrait masquer une éventuelle différence dans les gonades. Au stade 54+60j, les gonades étaient suffisamment grosses pour être séparées du mésonéphros. Nos analyses par PCR en temps réel ont alors montré une expression de *sox9* non seulement dans les testicules mais aussi dans les ovaires ainsi qu'une expression plus importante chez les mâles. Cette dernière a été également confirmée par une expression de *sox9* enrichie dans les gonades des larves génétiquement femelles élevées à 32°C (ZW³²) qui se différencient en testicules. Il serait intéressant de réaliser des analyses complémentaires par HIS sur des complexes GM dès le

stade 42 afin de définir exactement le début de l'expression gonadique de *sox9* et d'avoir une idée sur un éventuel dimorphisme plus précoce de cette expression.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez plusieurs amphibiens anoures : d'une part, l'expression de *sox9* ne présente pas un dimorphisme sexuel aux stades précoces de la différenciation gonadique, et d'autre part, l'expression enrichie chez les mâles se produit à un stade tardif de la différenciation des gonades. En effet, chez *Rana rugosa*, pendant le développement des têtards, les deux isoformes *sox9 α* et *β* sont présentes non seulement dans les testicules, mais aussi dans les ovaires, et l'expression « mâle-spécifique » n'apparaît que deux mois après la métamorphose (Takase *et al.*, 2000). Une expression similaire a été observée chez *Xenopus laevis* où l'ARNm de *sox9* s'exprime dans les complexes GM des stades 53 à 56 chez les mâles et les femelles (Osawa *et al.*, 2005). Chez le crapaud *Bufo marinus*, le niveau de l'ARNm de *sox9* est comparable dans l'ovaire et le testicule au moment de la métamorphose connue comme une phase de différenciation présexuelle. Cependant, au stade de 20 mm, lorsque la différenciation est en cours, une expression majoritairement mâle a été observée (Abramyan *et al.*, 2009). Contrairement à ces espèces, chez *Xenopus tropicalis*, l'ARNm et la protéine Sox9 ne sont détectés dans les deux sexes qu'après la métamorphose, lorsque les gonades sont bien différenciées, et elle persiste jusqu'au stade adulte suggérant que Sox9 n'est pas nécessaire pour le déclenchement des premiers événements de la différenciation gonadique (El Jamil *et al.*, 2008).

Il était important de compléter les données sur les messagers par des données sur la protéine Sox9. Effectivement, chez l'homme et la souris, ce facteur de transcription est exprimé dans le cytoplasme de cellules somatiques dans les gonades indifférenciées des deux sexes, mais il est ensuite transloqué dans le noyau dans l'embryon mâle tandis qu'elle reste cytoplasmique chez la femelle (da Silva *et al.*, 1996; de Santa Barbara *et al.*, 2000).

La présence de différents signaux de localisation nucléaire nNLS et cNLS ainsi qu'un signal d'export nucléaire (NES) ont été décrits (Preiss *et al.*, 2001; Argentaro *et al.*, 2003; Gasca *et al.*, 2002). La comparaison de la séquence protéique du pleurodèle avec celle d'autres espèces montre que les différents signaux de transport sont bien conservés chez notre modèle. En plus, comme SOX9 est une cible de la signalisation de l'AMPC et sa phosphorylation par la PKA sur deux sérines (S64, S181) induit sa translocation nucléaire chez la souris (Malki *et al.*, 2005), la présence de la sérine (S182) chez le pleurodèle, pourrait être aussi importante pour la translocation nucléaire de Sox9 dans les gonades mâles. Des analyses par immunofluorescence ont donc été envisagées avec un anticorps dirigé contre la

protéine SOX9 humaine. La production d'une protéine de fusion thiorédoxine-Sox9 a permis de vérifier que la protéine de pleurodèle était bien reconnue par cet anticorps. Sur des coupes histologiques de complexes GM d'individus au stade 56 (fin de la métamorphose), une localisation nucléaire de Sox9 a été observée dans les cellules somatiques et germinales du testicule, tandis que dans l'ovaire, Sox9 est cytoplasmique. Des études sur des stades plus précoces devraient être réalisées. En outre, l'expression de SOX9 dans les cellules de Sertoli a été aussi rapportée chez d'autres espèces tels que les oiseaux (Vaillant *et al.*, 2001a; Oréal *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2009), les reptiles (Matsumoto & Crews, 2012), les poissons (Siegfried, 2010) et les amphibiens (El Jamil *et al.*, 2008). La localisation nucléaire de SOX9 dans les CG des testicules lui confère un rôle qui reste à élucider.

Nos résultats suggèrent que chez le pleurodèle comme chez d'autres amphibiens, Sox9 pourrait ne jouer qu'un rôle tardif au cours de la différenciation des gonades et ne pas intervenir dans le déterminisme du sexe. Si les études complémentaires confirmaient cela, nous pourrions envisager qu'une autre protéine Sox puisse être impliquée dans le déterminisme du sexe chez le pleurodèle. Sox8, un gène proche de Sox9, est par exemple exprimé au cours de la différenciation sexuelle chez la souris (Takada & Koopman, 2003). La recherche d'autres protéines SOX pourrait donc être envisagée chez le pleurodèle.

Par ailleurs, sur des coupes de testicules adultes, une structure cytoplasmique granulaire située près du noyau des spermatogonies est marquée par l'anti-SOX9. Des études par microscopie électronique seraient nécessaires afin de déterminer ce qu'est cette structure.

II. Sox9 joue-t-il un rôle au cours de l'ovogenèse chez le pleurodèle ?

L'expression de SOX9 a été étudiée dans l'ovaire adulte de plusieurs vertébrés. Chez la souris par exemple, l'expression de SOX9 a été examinée à différents stades de folliculogenèse. Elle est absente dans l'ovaire immature, alors qu'elle s'exprime d'une manière transitoire dans l'ovaire mature selon le cycle folliculaire. Ainsi, SOX9 se localise uniquement dans les noyaux des cellules de la thèque interne entourant les follicules pré-antraux/antraux (Notarnicola *et al.*, 2006). En revanche, chez le poisson zèbre adulte, l'ARNm de *sox9b* est limité au cytoplasme des ovocytes I, II et III (Chiang *et al.*, 2001; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005). De même, chez le medaka, *sox9* s'exprime dans les ovocytes à tous les stades de vitellogenèse (du stade I au stade VI) (Yokoi *et al.*, 2002). Chez les amphibiens, l'expression de Sox9 dans la gonade femelle semble varier selon les espèces. En

effet, chez *R. rugosa*, Sox9 est absente dans l'ovaire adulte (Takase *et al.*, 2000). Chez *B. marinus*, une expression cytoplasmique de Sox9 a été observée dans les ovocytes prévitellogéniques au stade I et II (Abramyan *et al.*, 2009). Par ailleurs, aucune expression n'a été trouvée dans l'ovaire de *X. laevis* (Osawa *et al.*, 2005) alors que chez *X. tropicalis*, l'ARNm et la protéine Sox9 ont été trouvés au niveau des CG femelle. En effet, au début de l'ovogenèse, Sox9 est détectée uniquement dans le cytoplasme. Cependant, au cours de la vitellogenèse, elle est détectée dans les noyaux (El Jamil *et al.*, 2008). Cette translocation nucléaire de Sox9 dans les ovocytes pourrait lui conférer un rôle au cours de l'ovogenèse.

Nous avons étudié Sox9 chez le pleurodèle adulte. La protéine a été trouvée dans les ovocytes folliculés à tous les stades de la vitellogenèse. La présence de Sox9 résulte de son expression dans l'ovocyte plutôt que dans les cellules folliculaires, comme le montre la défolliculation des ovocytes au stade VI. En outre, l'énucléation des ovocytes de stade VI n'a pas changé ce profil d'expression, ce qui suggère une localisation cytoplasmique de Sox9 dans les ovocytes du pleurodèle, que nous avons confirmée par immunohistochimie : Sox9 se trouve dans le cytoplasme périnucléaire des ovocytes de stade I et au niveau du cortex des ovocytes de stade VI. Toutefois, aucune localisation nucléaire de Sox9 dans les ovocytes du pleurodèle n'a été détectée.

Nos résultats suggèrent donc que Sox9, en tant que facteur de transcription, ne peut pas réguler l'expression de gènes cibles dans les ovocytes, et donc le rôle potentiellement joué par Sox9 dans les ovocytes doit être élucidé. Sox9 pourrait agir comme un partenaire pour une autre protéine capable de jouer un rôle au cours de la maturation des ovocytes et/ou au cours des premiers stades du développement embryonnaire. Pour que cela soit clarifié, nous pourrions tenter des études sur la perte de fonction de Sox9 induite par l'inhibition de son expression grâce à des morpholinos injectés dans les ovocytes de pleurodèle. Par cette méthode, nous pourrions déterminer l'implication de cette protéine dans la maturation des ovocytes, la fécondation voire les premières étapes du développement.

III. L'Amh est-elle un bon marqueur de la différenciation testiculaire chez le pleurodèle ?

Un certain nombre d'études ont été faites sur l'AMH chez les vertébrés. En général, l'AMH montre un profil d'expression conservé entre les vertébrés, les niveaux d'expression étant souvent plus élevés chez les mâles que chez les femelles au cours de la différenciation

sexuelle. Cela a été montré chez les mammifères (Münsterberg & Lovell-Badge, 1991; Hirobe *et al.*, 1992), le poulet (Smith *et al.*, 1999; Oréal *et al.*, 2002), l'alligator (Western *et al.*, 1999a; Urushitani *et al.*, 2011), la tortue (Shoemaker *et al.*, 2007; Takada *et al.*, 2006), et plusieurs espèces de poissons (Yoshinaga *et al.*, 2004; Baron *et al.*, 2005; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; Ijiri *et al.*, 2008).

Nous nous sommes intéressés à rechercher cette hormone chez le pleurodèle, d'une part, car aucune donnée n'était disponible sur l'*Amh* chez les amphibiens, et d'autre part, car notre modèle est un vertébré original dont les canaux de Müller persistent sans régresser et sans se différencier chez les mâles. Nous avons isolé un ADNc partiel de l'*Amh* de pleurodèle et analysé son expression.

III.1. L'*amh* présente une expression dimorphique avant le début de la différenciation histologique des gonades chez le pleurodèle

Une expression précoce de l'*amh* dès le stade 50, où les gonades sont indifférenciées, a été détectée. Cette expression se poursuit au cours de la différenciation gonadique au stade 54 et stade 54+60j. A tous ces stades, l'expression de l'*amh* est significativement plus élevée dans la gonade mâle que la gonade femelle. La présence de l'*amh* dans le complexe GM aux stades 50 et 54 est seulement due à son expression dans les gonades car aucune expression n'a été détectée dans le mésonéphros isolé (tout au moins aux stades 54+30j et 54+60j). Après la métamorphose, les transcrits d'*amh* diminuent dans les testicules alors qu'ils restent faible dans l'ovaire. A l'âge adulte, un signal d'ARNm d'*amh* a été détecté dans les gonades mâles et femelles.

Ce profil montrant une expression plus importante de l'*amh* chez les pleurodèles mâles, détectable avant le début de la différenciation histologique des gonades et qui s'accroît au stade 54+60j, est en accord avec celui observé chez les oiseaux et les poissons. En effet, chez les oiseaux, l'expression de l'*AMH* débute au stade 28 avant la différenciation gonadique qui survient au stade 30. Elle est exprimée dans les deux sexes à un niveau identique, puis son expression augmente chez les mâles (Oréal *et al.*, 2002). De plus, chez certains poissons téléostéens tels que le poisson-zèbre, l'*amh* s'exprime dans les deux sexes au stade des gonades indifférenciées puis, au cours de la différenciation sexuelle, le niveau d'expression devient nettement plus élevé chez les mâles (Rodríguez-Marí *et al.*, 2005). En revanche, chez le medaka, alors que l'*amh* est exprimée dans les gonades indifférenciées, le niveau de

l'expression reste ensuite similaire dans les deux sexes (Klüver *et al.*, 2007). Cependant, ce profil d'expression de l'*amh* chez le pleurodèle semble différent de celui observé chez les mammifères où l'expression de l'*Amh* survient au début de la formation des cordons testiculaires et de la différenciation des cellules de Sertoli (Rey *et al.*, 2003). A titre d'exemple, chez les bovins mâles, l'AMH est détectable pendant la différenciation des tubules séminifères avec un pic au moment de la régression des canaux de Müller. Ce niveau d'expression est stable jusqu'à la naissance, puis il diminue (Vigier *et al.*, 1983).

Nos études HIS dans le testicule de juvéniles ont montré une localisation des ARNm de l'*amh* dans les lobules du testicule et vraisemblablement dans les cellules somatiques de ces structures qui pourraient être équivalentes aux cellules de Sertoli. En plus, les études protéiques ont suggéré que l'*Amh* pouvait être traduite et sécrétée par le testicule adulte puisqu'un signal *Amh* a pu être observé après 8 heures de culture dans un milieu conditionné (TCM : *Testis-Conditioned Medium*). Au stade adulte, le signal est plus fort dans le testicule que dans l'ovaire. Ces signaux à 72 kDa ont été obtenus à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'AMH bovine (Mab 168) qui réagit également contre l'AMH ovine et caprine et qui a le même poids moléculaire. Récemment, une étude similaire a été réalisée chez le poulet en cultivant deux testicules embryonnaires (de 11-18 jours d'incubation) pendant 3 jours mais en utilisant, pour l'immunoblot, un sérum anti-AMH produite dans un lapin contre la partie C-terminale de l'AMH humaine (Johnson *et al.*, 2008; 2009). Une bande d'AMH a été détectée dans le TCM à la taille correspondant à l'AMH mammalienne à 70 kDa (Johnson *et al.*, 2009), confirmant le fait que l'AMH est sécrétée par le testicule.

Il serait intéressant de produire un outil immunologique dirigé contre l'*Amh* de pleurodèle et de confirmer ces résultats. Il serait aussi intéressant de réaliser des cultures organotypiques avec des testicules prélevés sur des larves au stade 54+60j où l'expression semble la plus forte.

III.2. Une expression élevée de l'*amh* est toujours en accord avec un développement testiculaire lors d'inversions sexuelles chez le pleurodèle

Nous avons analysé l'expression de l'*amh* lors de traitements induisant une inversion du sexe chez le pleurodèle. Après une masculinisation des larves femelles par un élevage à 32°C au cours de la période thermosensible, nous avons observé au stade 54+60j une expression significativement plus élevée de l'*amh* chez ces larves par rapport aux larves témoins élevées à 20°C. L'effet de l'inversion de sexe par ce traitement thermique a été confirmé, d'une part,

par le faible niveau d'expression de l'aromatase, l'enzyme synthétisant les œstrogènes (Kuntz *et al.*, 2003a; Ko *et al.*, 2008), et d'autre part, par l'absence d'expression de la recombinaison Dmc1, marqueur de l'entrée en méiose qui s'exprime plus tardivement lors de la différenciation testiculaire. À contrario, après un traitement par l'E₂ administré à des larves ZZ pendant la période hormono-sensible et connu pour avoir une action féminisante, nous avons observé une expression faible de l'*amh*, significativement différente de celle des larves ZZ témoins. Elle était associée à une expression élevée de l'*aromatase* ainsi qu'à une expression de *dmc1*. L'ensemble de nos résultats suggère donc que l'*amh* est un bon marqueur testiculaire : elle apparaît en cas de masculinisation des larves ZW et ne s'élève pas en cas de féminisation des larves ZZ.

L'expression de l'*amh* et de l'*aromatase* sont aussi modifiées chez d'autres vertébrés en réponse à l'action de la température ou des hormones stéroïdes. Chez le tilapia (*Oreochromis niloticus*) qui présente un déterminisme génétique du sexe de type XX/XY, les températures élevées (34-35°C) peuvent inverser les individus génétiquement femelles en mâles phénotypiques fonctionnels lorsqu'elles sont appliquées durant la période thermosensible critique pour la différenciation gonadique (Baroiller *et al.*, 1995). Les individus TM XX (*Temperature Masculinised*) présentent une augmentation de l'expression de l'*amh* (Baroiller *et al.*, 2009a) ainsi qu'une diminution de l'expression de l'*aromatase* (D'Cotta *et al.*, 2001). De même, chez le poisson *Japanese flounder* (*Paralichthys olivaceus*), le système XX/XY de détermination du sexe peut être affecté par un élevage à 27°C qui inverse les individus XX en mâles phénotypiques chez lesquels l'*amh* est fortement exprimée alors que l'*aromatase* ne s'exprime pas (Yoshinaga *et al.*, 2004; Kitano *et al.*, 1999). Par ailleurs, chez certains reptiles comme la tortue *Trachemys scripta*, la détermination de sexe dépend uniquement de la température d'incubation des œufs. La température d'incubation à 26°C détermine le sexe mâle (MPT : *Male Producing Temperature*), alors que la température d'incubation à 31,5°C produit les femelles (FPT : *Female Producing Temperature*). L'*amh* montre une expression élevée dans des gonades des embryons incubés à MPT, mais une expression faible dans des gonades des embryons incubés à FPT (Shoemaker *et al.*, 2007). En revanche, une forte expression de l'*aromatase* a été observée dans les gonades incubées à FPT, tandis qu'une faible expression a été observée à la MPT (Ramsey & Crews, 2009). Chez l'alligator, une expression élevée d'*amh* a été mise en évidence chez les embryons incubés à MPT : 33°C, mais pas chez les embryons incubés à FPT : 30°C (Western *et al.*, 1999a). À l'inverse, l'expression de l'*aromatase* augmente significativement chez les embryons incubés à FPT juste après la TSP (Gabriel *et al.*, 2001).

Ce déterminisme du sexe température-dépendant existe chez le pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, un poisson gonochorique avec une forte TSD. L'élevage des larves au cours de la TSP (entre l'éclosion et le début de la différenciation histologique des gonades) à la température de 17°C ou 29°C donne des femelles ou des mâles, respectivement (Strüssmann *et al.*, 1997). L'expression de l'*amh* est élevée chez les larves incubées à MPT (Fernandino *et al.*, 2008a), alors que l'*aromatase* est élevée au cours de la différenciation à FPT (Fernandino *et al.*, 2008b). Durant la TSP, les températures intermédiaires (24-25°C) (MixPT : *Mixed-sex Producing Temperature*) donnent lieu à une population mixte contenant mâles et femelles. Les auteurs ont démontré que le traitement des larves avec l'E₂ durant la période critique de la différenciation sexuelle réduit constamment l'expression d'*amh* à des niveaux comparables à ceux observés à FPT. En revanche, le traitement avec un inhibiteur de l'*aromatase* (fadrozole) induit l'augmentation de l'expression de l'*amh* ainsi que la masculinisation des larves élevées à MixPT, ce qui est susceptible d'être associé à une réduction des niveaux d'œstradiol (Fernandino *et al.*, 2008a). Par ailleurs, l'exposition des embryons à 1 jpf aux œstrogènes peut également supprimer l'expression de l'*amh* chez le poisson zèbre (Schulz *et al.*, 2007).

Sur les embryons de poulets, un traitement par le fadrozole peut entraîner la différenciation d'un testicule droit et un testicule ou un ovotestis gauche chez les individus ZW (Elbrecht & Smith, 1992), ainsi qu'une diminution de l'activité et de l'expression de l'*aromatase* et une augmentation d'expression de l'*AMH* dans les gonades inversées (Vaillant *et al.*, 2001a; b). Chez le pleurodèle, l'exposition de larves ZW à un inhibiteur d'*aromatase* (le fadrozole) conduit également à une diminution de l'activité enzymatique de l'*aromatase* avec l'apparition d'un développement mâle (Chardard & Dournon, 1999). Il serait intéressant d'analyser l'expression de l'*amh* après un tel traitement.

Au vu de ces résultats sur les effets de l'E₂, il serait intéressant de déterminer si l'effet sur l'expression de l'*amh* est direct ou indirect. Des ERE sont présents dans le promoteur de l'*Amh* chez les mammifères. L'isolement du promoteur de l'*amh* de pleurodèle permettrait de déterminer si de tels sites existent aussi dans notre modèle. Une approche cellulaire avec transfection d'un plasmide exprimant un gène rapporteur sous contrôle de ce promoteur pourrait alors être envisagée.

En conclusion, l'*Amh* est un très bon marqueur de la différenciation testiculaire chez le pleurodèle qui, avec l'*aromatase* et *Dmc1*, peut être utilisé comme outil moléculaire pour diagnostiquer précocement le sexe des gonades chez cette espèce.

IV. Pourquoi les canaux de Müller ne régressent-ils pas chez les pleurodèles mâles ?

Chez les amphibiens, au cours de la différenciation, les gonades produisent des hormones, principalement des stéroïdes, qui influencent la différenciation du tractus génital. Chez les larves femelles, les canaux de Wolff seront maintenus car ils seront nécessaires pour l'élimination de l'urine car il n'y a pas de métanéphros ni d'uretères secondaires comme c'est le cas chez les amniotes, et les canaux de Müller vont se différencier en oviductes. Chez les larves mâles, les canaux de Wolff vont se différencier en uro-spermiductes mais la situation des canaux de Müller est plus complexe. En effet, chez les anoures, ils disparaissent généralement, alors que chez les urodèles, ils vont souvent être maintenus sans se différencier (Dumond *et al.*, 2008a; Flament *et al.*, 2011). La persistance des canaux de Müller chez les mâles de pleurodèle peut être démontrée par un traitement à l'E₂ qui déclenche la différenciation des oviductes (Tiffchoche *et al.*, 1993). En plus, chez les larves de la salamandre *Ambystoma.tigrinum*, les combinaisons entre les oestrogènes et les androgènes (E₂-testostérone ou E₂-DHT, 12,5µg chacun pendant 25 jours) stimulent davantage que l'E₂ la croissance des canaux de Müller, alors que la croissance des canaux de Wolff est stimulée seulement par les androgènes et inhibée par l'E₂ (Norris *et al.*, 1997). De même, chez la salamandre *A.ambystoma*, l'E₂ et la DHT stimulent la prolifération cellulaire et l'hypertrophie des canaux de Müller ; tandis qu'une prolifération cellulaire des canaux de Wolff est seulement stimulée par la DHT (Clark *et al.*, 1998).

Mais pourquoi les canaux de Müller chez les mâles des urodèles ne régressent-ils pas ? Chez les mammifères, il est clair que la régression des canaux de Müller chez les mâles est une réponse à la liaison de l'AMH à son récepteur spécifique AMHR-II exprimé par les cellules mésenchymateuses entourant les cellules épithéliales (Jost, 1947; Josso, 2008). Chez les oiseaux, la régression des canaux de Müller chez les mâles est corrélée avec l'augmentation de l'expression de l'AMH. Chez les embryons femelles, bien que les ovaires présentent une activité AMH, seul le canal de Müller droit régresse (Hutson *et al.*, 1981). Le clonage de l'AMHR-II du poulet ainsi que l'étude de sa localisation et de son interaction avec l'AMH sera très important pour la compréhension de la différenciation sexuelle et la régression des canaux de Müller.

Toutefois, cet effet « anti-müllerien » de l'AMH n'a pas été observé chez les vertébrés inférieurs. En effet, la majorité des poissons n'ont pas de canaux de Müller et pourtant l'Amh s'exprime (Miura *et al.*, 2002; Yoshinaga *et al.*, 2004; Rodríguez-Marí *et al.*, 2005; von

Hofsten *et al.*, 2005; Baron *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006; Halm *et al.*, 2007; Klüver *et al.*, 2007; Shiraishi *et al.*, 2008; Ijiri *et al.*, 2008; Pala *et al.*, 2008; Baroiller *et al.*, 2009b; Poonlaphdecha *et al.*, 2011). Par ailleurs, chez le pleurodèle, un amphibien urodèle, les canaux de Müller persistent chez les mâles malgré la présence de l'Amh (notre travail), alors que ces canaux disparaissent chez les anoues mâles.

L'ensemble de ces données nous permet de poser les hypothèses suivantes :

- Le maintien des canaux de Müller chez les mâles des amphibiens urodèles pourrait être dû à l'absence du récepteur spécifique Amhr-II au niveau de ces canaux, alors que ce récepteur existerait chez les anoues, induisant, après liaison avec l'Amh, leur régression.
- Chez les amphibiens urodèles la signalisation Amh/Amhr-II pourrait avoir d'autres fonctions conservées dans la différenciation gonadique, distinctes de son rôle dans la régression des canaux de Müller qui a probablement été acquis plus tard au cours de l'évolution.

Donc, il est nécessaire de cloner le gène du récepteur *amhr-II* du pleurodèle et d'étudier son expression par HIS dans les canaux de Müller et dans les gonades afin de confirmer son absence dans les premiers et attester sa présence dans les secondes. Enfin, il pourrait également être intéressant de déterminer si d'autres urodèles expriment également l'Amh et de la comparer avec celle de pleurodèle en termes de séquence, d'expression et de localisation.

V. Quel rôle l'Amh joue-t-elle chez le pleurodèle ?

Comme il a été mentionné précédemment, chez le pleurodèle, l'AMH pourrait jouer un rôle dans la différenciation gonadique et donc plus particulièrement dans la différenciation testiculaire. Chez le medaka (*Oryzia latipes*), la mutation *hotei* dans le gène codant l'*amhr-II* inhibe la fixation de l'Amh sur son récepteur et induit un certain nombre d'anomalies phénotypiques remarquables notamment la prolifération excessive des CG qui débute à peu près au stade de l'éclosion quel que soit le sexe génétique du poisson (Morinaga *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2012a). Une entrée en méiose prématurée de ces CG est aussi observée chez les individus *hotei* homozygotes phénotypiquement mâles.

Chez le pleurodèle, le profil d'expression de l'*amh*, précoce par rapport à la différenciation gonadique et plus importante chez les mâles que chez les femelles, pourrait être en accord avec une régulation par l'Amh de la prolifération des CG. En effet, la prolifération des CG

augmente fortement chez les femelles (Dournon *et al.*, 1990; Dumond *et al.*, 2008a) au moment où l'expression de l'*amh* devient plus forte chez le mâle.

Par ailleurs, chez le poisson l'anguille japonaise, l'orthologue *amh* a été signalé comme une substance empêchant la spermatogenèse (eSRS21), car il montre une activité inhibitrice de l'initiation de ce processus dans un système de co-culture entre les cellules somatiques et germinales testiculaires (Miura *et al.*, 2002). Chez le flet japonais, l'ARNm de l'*amh* s'exprime dans les cellules de Sertoli entourant les spermatogonies mais pas les spermatocytes ni les spermatozoïdes (Yoshinaga *et al.*, 2004). Chez les rongeur, l'expression de l'*Amh* est maintenue à des niveaux élevés au cours du développement mâle, puis elle s'éteint au moment où les CG entrent en méiose à la puberté (Münsterberg & Lovell-Badge, 1991; Hirobe *et al.*, 1992). De même, chez l'homme, l'AMH est exprimée dans les cellules de Sertoli dans les tubules séminifères pré-méiotiques, mais ce n'est plus détectable dans les tubules contenant des spermatocytes primaires (Rey *et al.*, 1996a). Ces données peuvent suggérer l'implication de l'AMH dans le contrôle de la spermatogenèse. Chez le pleurodèle : la diminution de l'expression de l'*amh* après la métamorphose chez les mâles peut être corrélée avec la période où l'entrée en méiose des CG se produit (deux mois après la métamorphose).

Chez les souris femelles transgéniques surexprimant l'*Amh*, la progression des CG dans la prophase méiotique est bloquée dans l'ovaire fœtal. Ceci conduit à la dégénérescence des CG et à la régression de l'ovaire (Josso *et al.*, 1998). Chez le pleurodèle, les résultats d'expériences de parabioses embryonnaires montrent bien l'action d'hormones circulantes sur le développement gonadique. En effet, chez les parabioses ZZ/ZW, la différenciation testiculaire n'est pas affectée chez les ZZ alors que le développement ovarien des ZW est altéré. L'expression de *Pwdmc1* est absente dans les CG des gonades ZW au stade 54+60j et ces cellules vont dégénérer par la suite. L'*Amh* produite par les gonades ZZ pourrait être à l'origine du blocage de l'entrée en méiose des CG et de l'altération du développement ovarien des ZW (Dumond *et al.*, 2008b). L'*Amh* pourrait donc aussi être un facteur inhibiteur de la méiose chez le pleurodèle, et elle pourrait expliquer que les parabioses ZZ/ZW miment l'effet free-martin des bovidés.

Pour finaliser cette étude et bien comprendre le rôle d'*Amh* chez le pleurodèle, il serait intéressant de réaliser quelques expériences supplémentaires. Tout d'abord, nous pouvons envisager de produire une protéine recombinante de PwAmh en vue d'obtenir un anticorps dirigé contre l'*Amh* de pleurodèle. Si l'anticorps était neutralisant, cela nous permettrait de

tester le rôle de cette hormone sur la prolifération des CG et l'entrée en méiose en l'utilisant dans un système de culture organotypique de gonades larvaires.

En ce qui concerne la séquence nucléotidique et peptidique de l'Amh, malgré nos efforts pour obtenir la séquence entière, nous n'avons pas réussi à augmenter ces données. Nous ne pouvons pas expliquer ceci : ni les expériences de RACE-PCR ni celles utilisant à la fois une amorce *oligo-dT* et une amorce spécifique *Pwamh* n'ont donné de résultats. Nous avons également procédé à une purification du milieu de culture conditionné par le testicule de pleurodèle par chromatographie d'affinité en utilisant la lectine concanavaline-A afin de séquencer la protéine, puisque cette méthode a été utilisée avec succès pour purifier l'AMH de poulet (di Clemente *et al.*, 1992). Malheureusement, parmi les quelques bandes obtenues sur le gel d'acrylamide et sur la membrane après transfert, aucune n'a été détectée par l'anticorps anti-AMH et nous n'avons donc pas pu obtenir la séquence manquante de la partie N-terminale. Cela pourrait être à cause des processus de glycosylation qui pourraient être différents chez les amphibiens.

Les études fonctionnelles du gène de l'*amh* *in vivo* concernent une perspective à plus long terme. Pour une telle analyse, nous pourrions inhiber l'expression de l'*amh* en injectant des MOs dans la cavité péritonéale des larves de pleurodèle durant la période de différenciation gonadique. Par cette méthode nous pourrions déterminer l'implication de l'Amh dans la différenciation gonadique chez le pleurodèle.

La présence de l'*amh* chez le bar dans le cerveau et l'hypophyse ouvre la possibilité d'un contrôle autocrine de l'Amh sur la synthèse des gonadotrophines et des stéroïdes dans ces tissus (Halm *et al.*, 2007). De plus, il a été montré chez le tilapia une production précoce de stéroïdes et d'*amh* dans le cerveau (Baroiller *et al.*, 2009b). Nous avons effectué une étude sur l'expression de l'*amh* dans le cerveau de pleurodèle par RT-PCR à différents stades mais nos résultats n'ont révélé aucune différence significative pour l'expression de l'AMH entre les cerveaux de larves ZZ²⁰, ZW²⁰ et ZW³².

Enfin, l'expression inverse entre l'*amh* et l'*aromatase* observée chez le pleurodèle pourrait laisser envisager un rôle de l'Amh en tant que régulateur négatif de l'expression de l'*aromatase*. En effet, chez les reptiles, l'activité aromatase semble sensible à l'AMH hétérospécifique : de l'AMH extraite de testicules de bœuf réduit l'activité aromatase dans des cultures d'ovaires fœtaux de rat et de tortue (di Clemente *et al.*, 1992). De même, sur des cultures d'ovaires fœtaux de mouton, l'AMH bovine inhibe l'aromatase et provoque la sécrétion de testostérone à la place de l'œstradiol (Vigier *et al.*, 1989).

VI. Les cellules germinales ont-elles un rôle dans la différenciation gonadique chez le pleurodèle ?

Le rôle joué par les CG dans la différenciation des gonades a été étudié chez différents vertébrés, autant chez les mâles que chez les femelles (McCarrey & Abbott, 1982; McLaren, 1991; Trefil *et al.*, 2003; Shinomiya *et al.*, 2001; Slanchev *et al.*, 2005; Guigon & Magre, 2006; DiNapoli & Capel, 2007; Kurokawa *et al.*, 2007; Siegfried & Nüsslein-Volhard, 2008; Fujimoto *et al.*, 2010; Goto *et al.*, 2012; Piprek *et al.*, 2012). Toutes ces études ont été réalisées après une déplétion des CG par plusieurs méthodes différentes. Ici, nous avons étudié, pour la première fois, le rôle des CG dans la différenciation gonadique chez un amphibien urodèle, le pleurodèle.

Le Bu est décrit comme un agent efficace pour éliminer les CG chez diverses espèces telles que le rat (Hemsworth & Jackson, 1963a; b; Merchant-Larios & Coello, 1979), la caille (Reynaud, 1981; Hallett & Wentworth, 1991), les insectes (Richard-Mercier, 1977) et le medaka (Shinomiya *et al.*, 2001). Chez le pleurodèle, l'élimination des CG a été induite par l'exposition des larves au Bu pendant 3 jours au moment de l'éclosion (au stade 35). Tout d'abord, nous avons testé deux concentrations de 50 µg/ml et 25 µg/ml. La première dose était délétère car elle a induit une altération de la croissance des animaux ainsi que la mort avant le stade 54 de la plupart des larves, alors que la dose de 25 µg/ml a été bien tolérée. Les mâles et les femelles ont été touchés de manière identique par le Bu en termes de croissance. Ces deux concentrations ont été également testées chez le medaka, où les œufs ont été exposés au Bu pendant les stades embryonnaires 17-37 (Shinomiya *et al.*, 2001). À 25 µg/ml, le taux d'éclosion a légèrement diminué, mais les larves écloses se sont développées normalement. A des concentrations supérieures à 25 µg/ml, le taux d'éclosion a été considérablement réduit et à 50 µg/ml aucun embryon n'a éclos. Ce résultat chez le medaka montre que la toxicité de Bu est comparable à ce que nous avons obtenu chez le pleurodèle.

En ce qui concerne l'effet sur les CG, les analyses par RT-PCR de *vasa* ont montré que la perte des CG ne se produit pas immédiatement. En effet, la diminution de l'expression de *vasa* a été détectée à partir du stade 50 chez les deux sexes, et la perte totale de CG semble être un peu plus tardive chez les mâles (au stade 54+60j) que chez les femelles (au stade 54). Ces résultats obtenus ont été confirmés par les analyses histologiques des gonades traitées au Bu. La différence entre les mâles et les femelles concernant le moment de la perte complète des CG pourrait être liée à des différences de prolifération entre les deux sexes. En effet,

comme nous l'avons déjà mentionné, la prolifération des CG passe par 3 périodes chez le pleurodèle : la période P0 où les CG ne prolifèrent pas, la période P1 caractérisée par une prolifération modérée des CG, identique chez les larves ZZ et ZW et qui se termine au stade 50, et la période P2 durant laquelle la prolifération des CG est plus importante chez les larves ZW que chez les larves ZZ, conduisant à un plus grand nombre de CG chez les larves femelles que chez les mâles (634 et 489 respectivement par animal au stade 53) (Dournon *et al.*, 1990). Par ailleurs, les études menées chez les parabioses de pleurodèle, indiquent un nombre de CG chez les larves ZZ qui est identique aux stades 53 et 54, mais il augmente significativement au stade 54+60j (118 et 205 CG respectivement par gonade) (Dumond *et al.*, 2008b). Ces données montrent que les périodes relatives à une forte prolifération semblent être en corrélation avec le moment de la perte complète de CG induite par le Bu dans les deux sexes. Cependant, il serait nécessaire d'effectuer une analyse plus détaillée sur le nombre de CG aux stades 50 et 54 pour confirmer cette observation.

Chez les larves ZW exposées au Bu, malgré l'absence de CG, nous avons observé une différenciation ovarienne normale attestée, au stade 54, par la présence de la cavité centrale typique résultant de la dégénérescence médullaire. Au stade 54+60j, deux couches de cellules somatiques sont clairement observées dans le cortex de l'ovaire : une couche externe correspondant à l'épithélium cœlomique et une couche interne qui correspond à la médulla régressée. Chez le medaka, l'ovaire des individus traités Bu possède aussi une cavité ovarienne bien développée (Shinomiya *et al.*, 2001). De même, chez la tortue *Trachemys scripta*, les ovaires des animaux traités au Bu et déficients en CG, ont des critères morphologiques non modifiés : ils présentent un cortex et des lacunes dans la médulla (DiNapoli & Capel, 2007). Malgré l'absence de follicules, l'analyse de l'expression de l'aromatase au stade 54+60j des larves ZW traitées au Bu, est semblable à celle des larves ZW témoins, indiquant que les cellules productrices d'œstrogènes sont présentes. Cette expression de l'aromatase est comparable à celle habituellement observée dans les complexes GM pendant cette période de développement (Kuntz *et al.*, 2003b; Ko *et al.*, 2008). Nous n'avons pas observé une inversion de sexe chez les femelles traitées au Bu.

L'ensemble de ces résultats indique qu'à l'exception de l'absence de follicules, l'absence de CG n'influence pas les premières étapes de la différenciation ovarienne chez le pleurodèle. En effet, chez les mammifères, en l'absence de CG, les gonades XX ne peuvent pas former des follicules et elles subissent une dégénération de l'ovaire souvent associée à une inversion de sexe caractérisée par la présence de cordons séminifères composés de cellules ayant les

caractéristiques morphologiques des cellules de Sertoli (Guigon *et al.*, 2005). Par ailleurs, une inversion de sexe femelle-mâle se produit également chez le poisson-zèbre et chez le medaka en l'absence de CG (Slanchev *et al.*, 2005; Kurokawa *et al.*, 2007; Siegfried & Nüsslein-Volhard, 2008). En outre, chez l'amphibien *R. brevipoda*, bien que la sex-ratio des animaux dérivés d'œufs irradiés aux UV et appauvris en CG soit normal jusqu'après la métamorphose, une inversion mâle-femelle a été observée à l'âge de 2 ans correspondant à la maturité sexuelle (Shirane, 1982). Il serait donc intéressant de compléter notre étude chez le pleurodèle par une analyse histologique et moléculaire des gonades d'individus ZW adultes traités à l'éclosion au Bu.

Chez les individus ZZ traités au Bu, malgré l'absence de CG, nous avons également observé une différenciation testiculaire normale attestée au stade 54+60j par la présence d'un cortex mince et d'une médulla sans cavité. Nos études par RT-PCR ont montré que dans les complexes GM, les niveaux d'ARNm de l'*aromatase* sont identiques à ceux mesurés chez les larves mâles témoins. De plus, nos résultats supplémentaires concernant l'analyse par RT-PCR des marqueurs testiculaires ont montré la présence de l'expression de l'*amh* et de *sox9* dans les gonades ZZ traitées au Bu suggérant que l'absence de CG n'affecte pas le compartiment somatique masculin. L'étude histologique des gonades des juvéniles a confirmé définitivement le phénotype masculin : les gonades stériles présentent des lobules et des canaux efférents dont les ramifications sont plus faciles à observer que dans les testicules témoins.

Une critique pourrait être faite vis-à-vis de l'interprétation des résultats de ces expériences : les CG disparaissent finalement assez tardivement et nous ne pouvons exclure que les CG qui persistent à l'approche ou au tout début de la différenciation gonadique ne soient suffisantes pour continuer à exercer leur rôle dans la différenciation. Cependant, nous pensons, comme chez la tortue (DiNapoli & Capel, 2007), qu'il est peu probable que les CG résiduelles puissent contrôler la morphologie de l'ensemble des gonades, notamment dans les régions complètement dépourvues de CG. Par conséquent, nous proposons que les CG ne sont pas nécessaires pour la morphogenèse des testicules ou des ovaires au cours du développement chez le pleurodèle. Une méthode visant à éliminer les CGP du pleurodèle de façon plus ciblée en utilisant des MOs dirigés contre le gène *vasa* exprimé spécifiquement dans les CGP, pourrait être intéressante pour clarifier et préciser l'effet de l'absence de CG dans la différenciation gonadique chez le pleurodèle comme cela a été fait chez les poissons.

Deux modèles ont été proposés pour le rôle des CG dans la détermination du sexe : dans le premier modèle, les CG sont indispensables pour la différenciation des cellules somatiques dans l'ovaire, alors que le deuxième modèle envisage que les cellules somatiques des gonades se différencient de manière autonome et jouent également un rôle dans leur maintien.

De toute évidence, les données disponibles indiquent que la différenciation gonadique chez les mammifères, le poisson zèbre et le medaka est associée au premier modèle. En effet, il a été montré que la déplétion en CG aboutit à une inversion de sexe de type femelle-mâle des cellules somatiques, chez les mammifères (Guigon & Magre, 2006). En plus, d'autres études ont montré que le « knockdown » du *dnd*, un gène impliqué dans le développement et la migration des CGP, induit l'apoptose des CGP chez le poisson zèbre et chez le medaka, les gonades appauvries en CG se développant en testicules (Slanchev *et al.*, 2005; Kurokawa *et al.*, 2007; Siegfried & Nüsslein-Volhard, 2008). Par contre, chez le medaka, à l'opposé de ce qui se passe chez les femelles, l'absence de CG n'influence pas la différenciation des cellules somatiques chez le mâle (Shinomiya *et al.*, 2001). Ces données semblent donc indiquer que les CG sont capables d'influencer la différenciation des cellules somatiques chez la femelle.

D'autres vertébrés sont plutôt compatibles avec le deuxième modèle. Par exemple, chez la tortue *Trachemys scripta*, il a été démontré que la déplétion de CG ne modifie pas le développement morphologique des gonades fœtales (DiNapoli & Capel, 2007). Par ailleurs, il a été récemment montré chez la loche, *Misgurnus anguillicaudatus*, que l'absence de CG n'avait pas d'effet sur la différenciation des cellules somatiques des gonades. En effet, les gonades déficientes en CG se développent normalement en testicule et en ovaire, et les profils d'expression des gènes « gonade-spécifique » sont similaires à ceux exprimés dans les gonades normales (Fujimoto *et al.*, 2010). De même, chez le poisson rouge (*goldfish*), l'absence de CG n'influence pas le développement gonadique (Goto *et al.*, 2012). Nos résultats obtenus chez le pleurodèle indiquent que cet amphibien urodèle est conforme avec ce second modèle où les cellules somatiques se différencient indépendamment des CG, en accord avec le génotype sexuel.

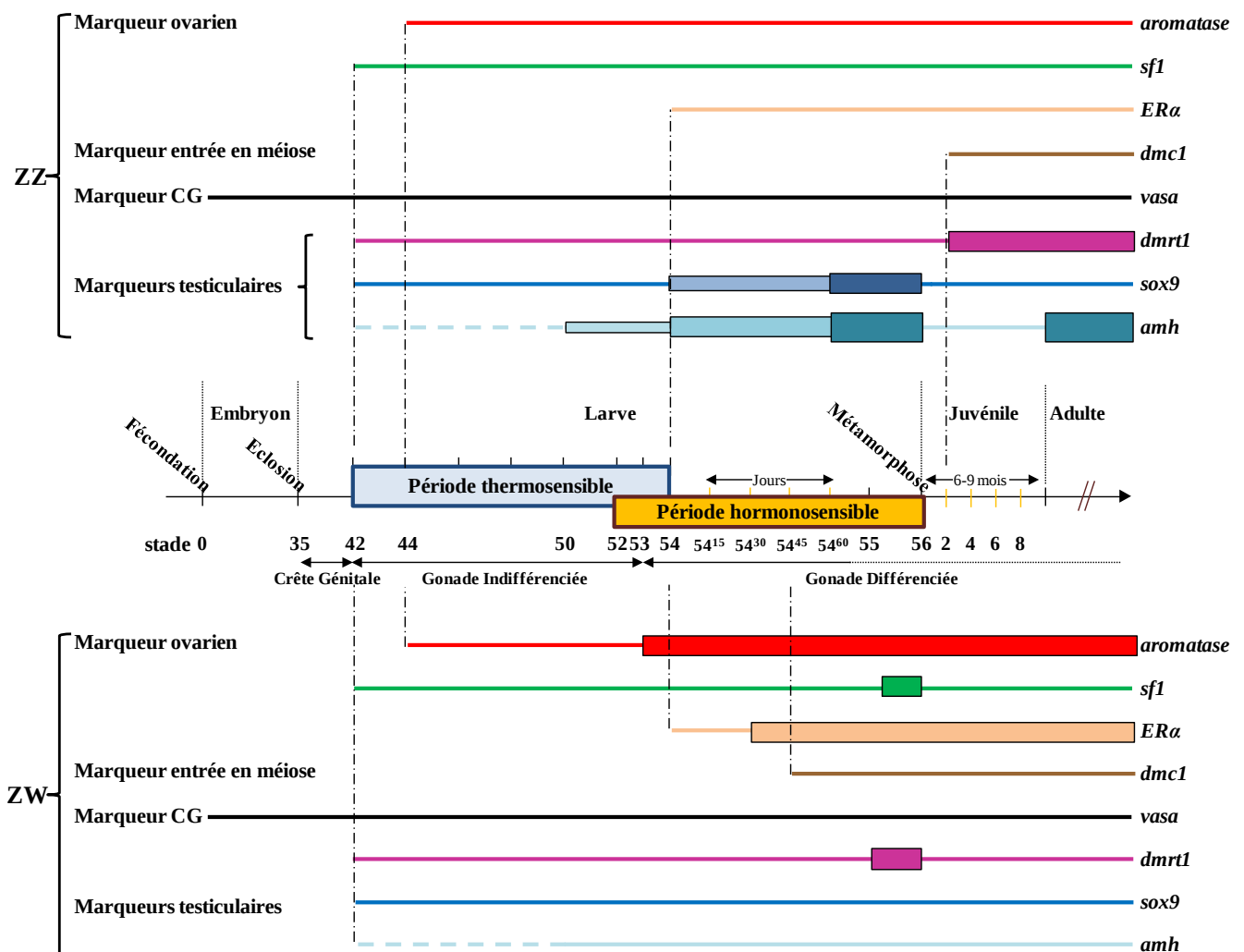


Figure 62 : Profil d'expression des marqueurs gonadiques au cours de la différenciation sexuelle chez *Pleurodeles waltl*. Tous les stades sont représentés dans l'axe de développement au centre. Les profils d'expression des huit gènes sont présentés chez les larves mâles ZZ et les larves femelles ZW : *aromatase* en rouge, *Sf1* en vert, *ERα* en saumon, *Dmc1* en marron, *Vasa* en noir, *Dmrt1* en violet, *Sox9* en bleu et l'*Amh* en turquoise. Les lignes minces indiquent une expression modérée et les lignes épaisses indiquent une forte expression. Les lignes pointillées indiquent une expression à déterminer dans le futur.

VII. Conclusion

Dans le contexte de la physiologie comparée de la reproduction, les amphibiens et en particulier les urodèles sont peu étudiés. Le travail effectué durant cette thèse a contribué à une meilleure caractérisation de la différenciation gonadique de l'espèce *Pleurodeles waltl*, qui présente un déterminisme génétique du sexe pouvant être influencé par des facteurs environnementaux comme la température.

L'étude de Sox9 indique que contrairement aux vertébrés supérieurs, il est probablement impliqué dans des stades tardifs de la différenciation testiculaire. En outre, son expression non seulement dans la gonade mais aussi dans le mésonephros rend difficile son utilisation comme marqueur de la différenciation testiculaire. L'Amh, de par son expression gonade spécifique qui est précocement plus élevée chez les individus ZZ que les ZW s'avère un excellent marqueur de la différenciation testiculaire. Le fait que les pleurodèles mâles voient les canaux de Müller persister malgré la présence de l'Amh suggère que la fonction primaire de cette hormone était en relation avec la différenciation gonadique et que sa fonction de régression des canaux de Müller n'est apparue que secondairement au cours de l'évolution.

Nos résultats permettent de compléter les profils d'expression d'autres gènes de la différenciation sexuelle (Figure 62). En ce qui concerne les CG, l'expression de la recombinaison Dmc1 permet de diagnostiquer la différenciation ovarienne chez les larves dans la mesure où l'entrée en méiose survient avant la métamorphose uniquement chez les individus ZW. En ce qui concerne les cellules somatiques, l'aromatase chez les larves ZW et l'AMH chez les larves ZZ s'avèrent être à ce jour les meilleurs marqueurs de la différenciation ovarienne et testiculaire respectivement.

Ces différents marqueurs ont été mis à profit pour caractériser le phénotype gonadique lors d'inversions sexuelles ou lors de développements atypiques comme en absence de CG. Ils ont permis de montrer que les CG ne semblent pas jouer de rôle dans la différenciation gonadique du pleurodèle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abduljabbar, M., Taheini, K., Picard, J.-Y., Cate, R.L., and Josso, N. (2012). Mutations of the AMH type II receptor in two extended families with persistent Müllerian duct syndrome: lack of phenotype/genotype correlation. *Horm. Res. Pædiatrics* 77, 291–297.
- Abramyan, J., Feng, C.-W., and Koopman, P. (2009). Cloning and expression of candidate sexual development genes in the cane toad (*Bufo marinus*). *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 2430–2441.
- Aige-Gil, V., and Simkiss, K. (1991). Sterilising embryos for transgenic chimaeras. *Br. Poult. Sci.* 32, 427–438.
- Akiyama, H. (2008). Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* 18, 213–219.
- Akiyama, H., Kamitani, T., Yang, X., Kandyil, R., Bridgewater, L.C., Fellous, M., Mori-Akiyama, Y., and de Crombrughe, B. (2005). The transcription factor Sox9 is degraded by the ubiquitin-proteasome system and stabilized by a mutation in a ubiquitin-target site. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 23, 499–505.
- Allard, S., Adin, P., Gouédard, L., di Clemente, N., Josso, N., Orgebin-Crist, M.C., Picard, J.Y., and Xavier, F. (2000). Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Dev. Camb. Engl.* 127, 3349–3360.
- Amack, J.D., and Yost, H.J. (2004). The T box transcription factor no tail in ciliated cells controls zebrafish left-right asymmetry. *Curr. Biol. CB* 14, 685–690.
- Andersen, C.Y., and Byskov, A.G. (2006). Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4064–4069.
- Angelopoulou, R., Lavranos, G., and Manolakou, P. (2012). Sex determination strategies in 2012: towards a common regulatory model? *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 10, 13.
- Arango, N.A., Lovell-Badge, R., and Behringer, R.R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: *in vivo* definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99, 409–419.
- Arango, N.A., Kobayashi, A., Wang, Y., Jamin, S.P., Lee, H.-H., Orvis, G.D., and Behringer, R.R. (2008). A mesenchymal perspective of Müllerian duct differentiation and regression in *Amhr2-lacZ* mice. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1154–1162.
- Argentaro, A., Sim, H., Kelly, S., Preiss, S., Clayton, A., Jans, D.A., and Harley, V.R. (2003). A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J. Biol. Chem.* 278, 33839–33847.
- Arnold, S.J., Maretto, S., Islam, A., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2006). Dose-dependent *Smad1*, *Smad5* and *Smad8* signaling in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 296, 104–118.
- Atsumi, Y., Yazawa, S., Usui, F., Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Tagami, T., Hiramatsu, K., Kagami, H., and Ono, T. (2009). Depletion of primordial germ cells (PGCs) by X-irradiation to extraembryonic region of chicken embryos and expression of xenotransplanted quail PGCs. *J. Poult. Sci.* 46(2), 136–143.
- Al-Attar, L., Noël, K., Dutertre, M., Belville, C., Forest, M.G., Burgoyne, P.S., Josso, N., and Rey, R. (1997). Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J. Clin. Invest.* 100, 1335–1343.
- Aramaki, S., Sato, F., Kato, T., Soh, T., Kato, Y., and Hattori, M.-A. (2007). Molecular cloning and expression of dead end homologue in chicken primordial germ cells. *Cell Tissue Res.* 330, 45–52.
- Aramaki, S., Kubota, K., Soh, T., Yamauchi, N., and Hattori, M. (2009). Chicken dead end homologue protein is a nucleoprotein of germ cells including primordial germ cells. *J. Reprod. Dev.* 55, 214–218.

- Baarends, W.M., van Helmond, M.J., Post, M., van der Schoot, P.J., Hoogerbrugge, J.W., de Winter, J.P., Uilenbroek, J.T., Karels, B., Wilming, L.G., and Meijers, J.H. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Dev. Camb. Engl.* 120, 189–197.
- Baarends, W.M., Uilenbroek, J.T., Kramer, P., Hoogerbrugge, J.W., van Leeuwen, E.C., Themmen, A.P., and Grootegoed, J.A. (1995a). Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 136, 4951–4962.
- Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Post, M., Visser, J.A., De Rooij, D.G., Parvinen, M., Themmen, A.P., and Grootegoed, J.A. (1995b). Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. *Endocrinology* 136, 5614–5622.
- Bachvarova, R.F., Masi, T., Drum, M., Parker, N., Mason, K., Patient, R., and Johnson, A.D. (2004). Gene expression in the axolotl germ line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axoct-4*, and *Axkit*. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 231, 871–880.
- Bachvarova, R.F., Crother, B.I., and Johnson, A.D. (2009a). Evolution of germ cell development in tetrapods: comparison of urodeles and amniotes. *Evol. Dev.* 11, 603–609.
- Bachvarova, R.F., Crother, B.I., Manova, K., Chatfield, J., Shoemaker, C.M., Crews, D.P., and Johnson, A.D. (2009b). Expression of *Dazl* and *Vasa* in turtle embryos and ovaries: evidence for inductive specification of germ cells. *Evol. Dev.* 11, 525–534.
- Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Jayakody, I., Taketo, M.M., Scherer, G., and Harley, V.R. (2008). Loss of *Fgfr2* leads to partial XY sex reversal. *Dev. Biol.* 314, 71–83.
- Bagheri-Fam, S., Sinclair, A.H., Koopman, P., and Harley, V.R. (2010). Conserved regulatory modules in the *Sox9* testis-specific enhancer predict roles for SOX, TCF/LEF, Forkhead, DMRT, and GATA proteins in vertebrate sex determination. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 472–477.
- Bakkum-Gamez, J.N., Aletti, G., Lewis, K.A., Keeney, G.L., Thomas, B.M., Navarro-Teulon, I., and Cliby, W.A. (2008). Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers. *Gynecol. Oncol.* 108, 141–148.
- Balemans, W., and Van Hul, W. (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.* 250, 231–250.
- Banroques, J., Cordin, O., Doère, M., Linder, P., and Tanner, N.K. (2008). A conserved phenylalanine of motif IV in superfamily 2 helicases is required for cooperative, ATP-dependent binding of RNA substrates in DEAD-box proteins. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3359–3371.
- Baroiller, J.F., and D’Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 130, 399–409.
- Baroiller, J.F., Chourrout, D., Fostier, A., and Jalabert, B. (1995). Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 273, 216–223.
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., and Saillant, E. (2009a). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 3, 118–135.
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., and Hoerstgen-Schwark, G. (2009b). Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 153, 30–38.
- Baroiller, J.-F., Guiguen, Y., and Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 910.

- Baron, D., Houlgatte, R., Fostier, A., and Guiguen, Y. (2005). Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 73, 959–966.
- Barrionuevo, F., and Scherer, G. (2010). SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 433–436.
- Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kist, R., Taketo, M.M., Englert, C., and Scherer, G. (2006). Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol. Reprod.* 74, 195–201.
- Barrionuevo, F., Naumann, A., Bagheri-Fam, S., Speth, V., Taketo, M.M., Scherer, G., and Neubüser, A. (2008). Sox9 is required for invagination of the otic placode in mice. *Dev. Biol.* 317, 213–224.
- Barrionuevo, F., Georg, I., Scherthan, H., Lécureuil, C., Guillou, F., Wegner, M., and Scherer, G. (2009). Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev. Biol.* 327, 301–312.
- Barrionuevo, F.J., Burgos, M., Scherer, G., and Jiménez, R. (2012). Genes promoting and disturbing testis development. *Histol. Histopathol.* 27, 1361–1383.
- Bártfai, R., and Orbán, L. (2003). The vasa locus in zebrafish: multiple RGG boxes from duplications. *DNA Cell Biol.* 22, 47–54.
- Beau, C., Vivian, N., Münsterberg, A., Dresser, D.W., Lovell-Badge, R., and Guerrier, D. (2001). *In vivo* analysis of the regulation of the anti-Müllerian hormone, as a marker of Sertoli cell differentiation during testicular development, reveals a multi-step process. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 256–264.
- Behringer, R.R. (1995). The müllerian inhibitor and mammalian sexual development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 350, 285–288; discussion 289.
- Behringer, R.R., Cate, R.L., Froelick, G.J., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1990). Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance. *Nature* 345, 167–170.
- Behringer, R.R., Finegold, M.J., and Cate, R.L. (1994). Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79, 415–425.
- Bell, D.M., Leung, K.K., Wheatley, S.C., Ng, L.J., Zhou, S., Ling, K.W., Sham, M.H., Koopman, P., Tam, P.P., and Cheah, K.S. (1997). SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.* 16, 174–178.
- Belville, C., Josso, N., and Picard, J.Y. (1999). Persistence of Müllerian derivatives in males. *Am. J. Med. Genet.* 89, 218–223.
- Belville, C., Van Vlijmen, H., Ehrenfels, C., Pepinsky, B., Rezaie, A.R., Picard, J.-Y., Josso, N., di Clemente, N., and Cate, R.L. (2004). Mutations of the anti-müllerian hormone gene in patients with persistent müllerian duct syndrome: biosynthesis, secretion, and processing of the abnormal proteins and analysis using a three-dimensional model. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 18, 708–721.
- Belville, C., Jamin, S.P., Picard, J.-Y., Josso, N., and di Clemente, N. (2005). Role of type I receptors for anti-Müllerian hormone in the SMAT-1 Sertoli cell line. *Oncogene* 24, 4984–4992.
- Belville, C., Maréchal, J.-D., Penetier, S., Carmillo, P., Masgrau, L., Messika-Zeitoun, L., Galey, J., Machado, G., Treton, D., Gonzalès, J., *et al.* (2009). Natural mutations of the anti-Müllerian hormone type II receptor found in persistent Müllerian duct syndrome affect ligand binding, signal transduction and cellular transport. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3002–3013.
- Benko, S., Fantes, J.A., Amiel, J., Kleinjan, D.-J., Thomas, S., Ramsay, J., Jamshidi, N., Essafi, A., Heaney, S., Gordon, C.T., *et al.* (2009). Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nat. Genet.* 41, 359–364.

- Bergadá, I., Milani, C., Bedecarrás, P., Andreone, L., Ropelato, M.G., Gottlieb, S., Bergadá, C., Campo, S., and Rey, R.A. (2006). Time course of the serum gonadotropin surge, inhibins, and anti-Müllerian hormone in normal newborn males during the first month of life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 4092–4098.
- Bergstrom, D.E., Young, M., Albrecht, K.H., and Eicher, E.M. (2000). Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genes. New York N* *2000* *28*, 111–124.
- Bernard, P., and Harley, V.R. (2010). Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 400–410.
- Bernard, P., Tang, P., Liu, S., Dewing, P., Harley, V.R., and Vilain, E. (2003). Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1755–1765.
- Bézar, J., Vigier, B., Tran, D., Mauléon, P., and Josso, N. (1987). Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *J. Reprod. Fertil.* *80*, 509–516.
- Bishop, C.E., Whitworth, D.J., Qin, Y., Agoulnik, A.I., Agoulnik, I.U., Harrison, W.R., Behringer, R.R., and Overbeek, P.A. (2000). A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet.* *26*, 490–494.
- Blázquez, M., González, A., Mylonas, C.C., and Piferrer, F. (2011). Cloning and sequence analysis of a vasa homolog in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): tissue distribution and mRNA expression levels during early development and sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* *170*, 322–333.
- Bougnères, P., François, M., Pantalone, L., Rodrigue, D., Bouvattier, C., Demesteere, E., Roger, D., and Lahlou, N. (2008). Effects of an early postnatal treatment of hypogonadotropic hypogonadism with a continuous subcutaneous infusion of recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 2202–2205.
- Boukari, K., Ciampi, M.L., Guiochon-Mantel, A., Young, J., Lombès, M., and Meduri, G. (2007). Human fetal testis: source of estrogen and target of estrogen action. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *22*, 1885–1892.
- Bowles, J., and Koopman, P. (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 3401–3411.
- Bowles, J., Schepers, G., and Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* *227*, 239–255.
- Bowles, J., Feng, C.-W., Spiller, C., Davidson, T.-L., Jackson, A., and Koopman, P. (2010). FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Dev. Cell* *19*, 440–449.
- Braat, A.K., van de Water, S., Goos, H., Bogerd, J., and Zivkovic, D. (2000). Vasa protein expression and localization in the zebrafish. *Mech. Dev.* *95*, 271–274.
- Britt, K.L., Kerr, J., O'Donnell, L., Jones, M.E.E., Drummond, A.E., Davis, S.R., Simpson, E.R., and Findlay, J.K. (2002). Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 1389–1397.
- Busse, U., and Séguin, C. (1993). Isolation of cDNAs for two closely related members of the axolotl Wnt family, Awnt-5A and Awnt-5B, and analysis of their expression during development. *Mech. Dev.* *40*, 63–72.
- Callebaut, M. (1968). Sterilization of the left ovary of the chicken and quail by the action of thymidine-3H during oogenesis. *Experientia* *24*, 944–945.
- Callebaut, M. (1969). Partial masculinization of genetic female chickens (*Gallus gallus*) after incorporation of 3H-thymidine during the period of oogenesis. *Experientia* *25*, 435–436.
- Capel, B., and Coveney, D. (2004). Frank Lillie's freemartin: illuminating the pathway to 21st century reproductive endocrinology. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* *301*, 853–856.

- Caruthers, J.M., and McKay, D.B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 123–133.
- Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T.Y., Quigley, C., and Crum, C.P. (2000). The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9585–9590.
- Cate, R.L., R.J. Mattaliano, C. Hession, and R. Farber (1986). Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45, 685–698.
- Cattanach, B.M., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D., and Barlow, J. (1982). Male, female and intersex development in mice of identical chromosome constitution. *Nature* 300, 445–446.
- Catteau-Jonard, S., Jamin, S.P., Leclerc, A., Gonzalès, J., Dewailly, D., and di Clemente, N. (2008). Anti-Müllerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4456–4461.
- Chaboissier, M.-C., Kobayashi, A., Vidal, V.I.P., Lützkendorf, S., van de Kant, H.J.G., Wegner, M., de Rooij, D.G., Behringer, R.R., and Schedl, A. (2004). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1891–1901.
- Chang, C., Dearden, P., and Akam, M. (2002). Germ line development in the grasshopper *Schistocerca gregaria*: vasa as a marker. *Dev. Biol.* 252, 100–118.
- Chardard, D., and Dournon, C. (1999). Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool.* 283, 43–50.
- Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C., and Dournon, C. (1995). Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 100–107.
- Chardard, D., Kuntz, S., Chesnel, A., and Flament, S. (2003). Effects of androgens on sex differentiation of the urodele *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 296A, 46–55.
- Chiang, E.F.-L., Pai, C.-I., Wyatt, M., Yan, Y.-L., Postlethwait, J., and Chung, B. (2001). Two Sox9 Genes on Duplicated Zebrafish Chromosomes: Expression of Similar Transcription Activators in Distinct Sites. *Dev. Biol.* 231, 149–163.
- Chue, J., and Smith, C.A. (2011). Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS J.* 278, 1027–1034.
- Ciofi, C., and Swingland, I.R. (1997). Environmental sex determination in reptiles. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 51, 251–265.
- Clark, E.J., Norris, D.O., and Jones, R.E. (1998). Interactions of gonadal steroids and pesticides (DDT, DDE) on gonaduct growth in larval tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 94–105.
- Clarke, T.R., Hoshiya, Y., Yi, S.E., Liu, X., Lyons, K.M., and Donahoe, P.K. (2001). Müllerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 946–959.
- Clarkson, M.J., and Harley, V.R. (2002). Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 13, 106–111.
- di Clemente, N., and Belville, C. (2006). Anti-Müllerian hormone receptor defect. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 599–610.
- di Clemente, N., Ghaffari, S., Pepinsky, R.B., Pieau, C., Josso, N., Cate, R.L., and Vigier, B. (1992). A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Dev. Camb. Engl.* 114, 721–727.

di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J.Y., Vigier, B., Josso, N., and Cate, R. (1994a). Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 8, 1006–1020.

di Clemente, N., Goxe B, Remy JJ, Cate R, Josso N, Vigier B, and Salesse R (1994b). Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 2, 553–558.

di Clemente, N., Josso, N., Gouédard, L., and Belville, C. (2003). Components of the anti-Müllerian hormone signaling pathway in gonads. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 9–14.

di Clemente, N., Jamin, S.P., Lugovskoy, A., Carmillo, P., Ehrenfels, C., Picard, J.-Y., Whitty, A., Josso, N., Pepinsky, R.B., and Cate, R.L. (2010). Processing of anti-müllerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 24, 2193–2206.

Cohen-Haguénauer, O., Picard, J.Y., Mattéi, M.G., Serero, S., Nguyen, V.C., de Tand, M.F., Guerrier, D., Hors-Cayla, M.C., Josso, N., and Frézal, J. (1987). Mapping of the gene for anti-müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.* 44, 2–6.

Collenot, A. (1973). Obtention par la méthode des greffes de gonades embryonnaires, d'une femelle à descendance unisexuée femelle, chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Experientia* 29, 885–887.

Collenot, G., and Collenot, A. (1977). L'activité 3 beta-hydroxystéroïde déshydrogénasique dans les gonades en différenciation de *Pleurodeles waltlii* (amphibien; urodèle); visualisation sur coupes sériées à l'aide d'une nouvelle technique histochimique. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 42.

Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P.N., and Lovell-Badge, R. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Dev. Camb. Engl.* 122, 509–520.

Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B., and Ornitz, D.M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104, 875–889.

Conover, D.O., and Heins, S.W. (1987). Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. *Nature* 326, 496–498.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37.

D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., and Baroiller, J.F. (2001). Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 265–276.

Coulombre, J.L., and Russell, E.S. (1954). Analysis of the pleiotropism at the W-locus in the mouse. The effects of W and Wv substitution upon postnatal development of germ cells. *J. Exp. Zool.* 126, 277–295.

Couse, J.F., Hewitt, S.C., Bunch, D.O., Sar, M., Walker, V.R., Davis, B.J., and Korach, K.S. (1999). Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286, 2328–2331.

DeFalco, T., and Capel, B. (2009). Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 457–482.

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

Dewulf, N., Verschueren, K., Lonnoy, O., Morén, A., Grimsby, S., Vande Spiegle, K., Miyazono, K., Huylebroeck, D., and Ten Dijke, P. (1995). Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 136, 2652–2663.

- Dillingham, M.S., Soultanas, P., and Wigley, D.B. (1999). Site-directed mutagenesis of motif III in PcrA helicase reveals a role in coupling ATP hydrolysis to strand separation. *Nucleic Acids Res.* 27, 3310–3317.
- DiNapoli, L., and Capel, B. (2007). Germ cell depletion does not alter the morphogenesis of the fetal testis or ovary in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 308, 236–241.
- Donahoe, P.K., Ito, Y., Price, J.M., and Hendren, W.H., 3rd (1977). Müllerian inhibiting substance activity in bovine fetal, newborn and prepubertal testes. *Biol. Reprod.* 16, 238–243.
- van Doren, M., Williamson, A.L., and Lehmann, R. (1998). Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr. Biol. CB* 8, 243–246.
- Dournon, C., and Houillon, C. (1985). Thermosensibilité de la différenciation sexuelle chez l'amphibien urodèle, *Pleurodeles waltlii* Michah. Conditions pour obtenir l'inversion du phénotype sexuel de toutes les femelles génétiques sous l'action de la température d'élevage. *Reprod. Nutr. Développement* 25, 671–688.
- Dournon, C., Guillet, F., Boucher, D., and Lacroix, J.C. (1984a). Cytogenetic and genetic evidence of male sexual inversion by heat treatment in the newt *Pleurodeles poireti*. *Chromosoma* 90, 261–264.
- Dournon, C., Houillon, C., Szmutyk, M., and Desrosiers et Lorthioit (1984b). Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien Urodèle : *Pleurodeles waltlii* Michah. *Reprod. Nutr. Développement* 24, 361–378.
- Dournon, C., Demassieux, C., Durand, D., and Lesimple, M. (1989). Primordial germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltli*: genetic control before gonadal differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 33, 477–485.
- Dournon, C., Houillon, C., and Pieau, C. (1990a). Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. Dev. Biol.* 34, 81–92.
- Dournon, C., Durand, D., Demassieux, C., and Lesimple, M. (1990b). Differential germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltli*: controls by sexual genotype and by thermal epigenetic factor before differentiation of sexual phenotype of gonads. *Int. J. Dev. Biol.* 34, 365–375.
- Dresser, D.W., Hacker, A., Lovell-Badge, R., and Guerrier, D. (1995). The genes for a spliceosome protein (SAP62) and the anti-Müllerian hormone (AMH) are contiguous. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1613–1618.
- Dumond, H., Kuntz, S., Chesnel, A., Ko, C.-I., Wallacides, A., Chardard, D., and Flament, S. (2008a). Sexual development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltli*. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 2, 104–114.
- Dumond, H., Maufröid, J.-P., Ko, C.-I., Chardard, D., Chesnel, A., and Flament, S. (2008b). Freemartin in the amphibian *Pleurodeles waltli*: parabiosis between individuals from opposite sex triggers both germ and somatic cells alterations during female gonad development. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 439–449.
- Durlinger, A.L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., and Themmen, A.P. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789–5796.
- Durlinger, A.L., Gruijters, M.J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., Rose, U.M., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., et al. (2001). Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142, 4891–4899.
- Durlinger, A.L.L., Visser, J.A., and Themmen, A.P.N. (2002a). Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reprod. Camb. Engl.* 124, 601–609.
- Durlinger, A.L.L., Gruijters, M.J.G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., Uilenbroek, J.T.J., Grootegoed, J.A., and Themmen, A.P.N. (2002b). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076–1084.

- Dutertre, M., Rey, R., Porteu, A., Josso, N., and Picard, J.Y. (1997). A mouse Sertoli cell line expressing anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 136, 57–65.
- Dutertre, M., Gouédard, L., Xavier, F., Long, W.Q., di Clemente, N., Picard, J.Y., and Rey, R. (2001). Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Müllerian hormone in transgenic mice. *Endocrinology* 142, 4040–4046.
- Eggert, C. (2004). Sex determination: the amphibian models. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 539–549.
- El Jamil, A., Kanhoush, R., Magre, S., Boizet-Bonhoure, B., and Penrad-Mobayed, M. (2008). Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis*. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 2996–3005.
- Elbrecht, A., and Smith, R.G. (1992). Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255, 467–470.
- Eusèbe, D.C., Clemente, N. di, Rey, R., Pieau, C., Vigier, B., Josso, N., and Picard, J.-Y. (1996). Cloning and Expression of the Chick Anti-Müllerian Hormone Gene. *J. Biol. Chem.* 271, 4798–4804.
- Ewen, K.A., and Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 76–93.
- Extavour, C.G., and Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* 130, 5869–5884.
- Fallat, M.E., Siow, Y., Belker, A.M., Boyd, J.K., Yoffe, S., and MacLaughlin, D.T. (1996). The presence of müllerian inhibiting substance in human seminal plasma. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 11, 2165–2169.
- Fanchin, R., Salomon, L., Castelo-Branco, A., Olivennes, F., Frydman, N., and Frydman, R. (2003). Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18, 2698–2703.
- Fanchin, R., Mendez Lozano, D.H., Frydman, N., Gougeon, A., di Clemente, N., Frydman, R., and Taieb, J. (2007). Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by *in vitro* fertilization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1796–1802.
- Faure, E., Gouédard, L., Imbeaud, S., Cate, R., Picard, J.-Y., Josso, N., and Di, N.C. (1996). Mutant Isoforms of the Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor Are Not Expressed at the Cell Membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 30571–30575.
- Fénichel, P., Rey, R., Poggioli, S., Donzeau, M., Chevallier, D., and Pointis, G. (1999). Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 14, 2020–2024.
- Ferguson-Smith, M. (2007). The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of DMRT1. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* 1, 2–11.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Kimura, H., Strüssmann, C.A., and Somoza, G.M. (2008a). Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 3192–3199.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Shinoda, T., Kimura, H., Strobl-Mazzulla, P.H., Strüssmann, C.A., and Somoza, G.M. (2008b). Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* 2, 316–324.

- Ferrier, V., Gasser, F., Jaylet, A., and Cayrol, C. (1983). A genetic study of various enzyme polymorphisms in *Pleurodeles waltlii* (Urodele Amphibian). II. Peptidases: demonstration of sex linkage. *Biochem. Genet.* *21*, 535–549.
- Flament, S., Dumond, H., Chardard, D., and Chesnel, A. (2009). Lifelong testicular differentiation in *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Caudata). *Reprod. Biol. Endocrinol.* *7*, 21.
- Flament, S., Chardard, D., Chesnel, A., and Dumond, H. (2011). Chapter 1 - Sex Determination and Sexual Differentiation in Amphibians. In *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, David O. Norris, and Kristin H. Lopez, eds. (London: Academic Press), pp. 1–19.
- Fleming, A., Wibbels, T., Skipper, J.K., and Crews, D. (1999). Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* *116*, 336–346.
- Forwood, J.K., Harley, V., and Jans, D.A. (2001). The C-terminal nuclear localization signal of the sex-determining region Y (SRY) high mobility group domain mediates nuclear import through importin beta 1. *J. Biol. Chem.* *276*, 46575–46582.
- Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanović, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., Goodfellow, P.N., *et al.* (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* *372*, 525–530.
- Fried, H., and Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *60*, 1659–1688.
- Fujimoto, T., Nishimura, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Yamaha, E., and Arai, K. (2010). Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17211–17216.
- Fujisawa, M., Yamasaki, T., Okada, H., and Kamidono, S. (2002). The significance of anti-Müllerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis. *Hum. Reprod.* *17*, 968–970.
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., and Noce, T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12258–12262.
- Furumatsu, T., and Asahara, H. (2010). Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex. *Acta Med. Okayama* *64*, 351–357.
- Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y., and Asahara, H. (2005). Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J. Biol. Chem.* *280*, 8343–8350.
- Furumatsu, T., Ozaki, T., and Asahara, H. (2009). Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1198–1204.
- Gabriel, W.N., Blumberg, B., Sutton, S., Place, A.R., and Lance, V.A. (2001). Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures. *J. Exp. Zool.* *290*, 439–448.
- Galaup, A., and Paci, A. (2013). Pharmacology of dimethanesulfonate alkylating agents: busulfan and treosulfan. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *9*, 333–347.
- Gallien, L. (1950). Inversion du sexe (féminisation) chez l'urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah, traité par le benzoate d'oestradiol. *Comptes Rendus Académie Sci.* *231*, 919–920.
- Gallien, L. (1951). Unisexual progeny of a female *Pleurodeles Waltlii* Michah, subjected, during the larval stage, to the gynogenic effect of estradiol benzoate. *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci.* *233*, 828–830.
- Gallien, L. (1954). Inversion expérimentale du sexe sous l'action des hormones sexuelles chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michach. Analyse des conséquences génétiques. *Bull. Biol. Fr. Belg.* *88*, 1–51.

- Gallien, L. (1955). Descendance unisexuelle d'une femelle de *Xenopus laevis* daud ayant subi, pendant sa phase larvaire, l'action gynogene du benzoate d'oestradiol. *Comptes Rendus Académie Sci.* 240, 913.
- Gallien, L. (1962). Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl* 1, 346–355.
- Gallien, L. (1967). Developpement d'individus haploides adultes élevés en parabiose chez le triton. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 18, 401–426.
- Gallien, L., and Durocher, M. (1957). Table chronologique du developpement chez *Pleurodeles waltlii michah*. *Bull.Biol.Fr.Belg* 91, 97–114.
- Gallien, L., Labrousse, M., Picheral, B., and Lacroix, J.C. (1965). Experimental karyotype changes in a urodele amphibian (*Pleurodeles waltlii michah*) due to irradiation of the egg and nuclear grafting. *Rev. Suisse Zool. Ann. Société Zool. Suisse Muséum Hist. Nat. Genève* 72, 59–85.
- Gallien, L., Labrousse, M., and Lacroix, J.C. (1966). Detection in mitotic chromosomes and lampbrush chromosomes of anomalies caused by irradiation of the ovum, in urodelan amphibia, *Pleurodeles waltlii Michah*. *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci. Série Sci. Nat.* 263, 1984–1987.
- Gasca, S., Canizares, J., de Santa Barbara, P., Mejean, C., Poulat, F., Berta, P., and Boizet-Bonhoure, B. (2002). A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11199–11204.
- Georges, A., Ezaz, T., Quinn, A.E., and Sarre, S.D. (2010). Are reptiles predisposed to temperature-dependent sex determination? *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 4, 7–15.
- Ghisolfi, L., Joseph, G., Amalric, F., and Erard, M. (1992). The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J. Biol. Chem.* 267, 2955–2959.
- Giese, K., Pagel, J., and Grosschedl, R. (1994). Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 3368–3372.
- Giuli, G., Shen, W.H., and Ingraham, H.A. (1997). The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, *in vivo*. *Dev. Camb. Engl.* 124, 1799–1807.
- Goder, V., and Spiess, M. (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett.* 504, 87–93.
- Gorbalenya, A.E., and Koonin, E.V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 419–429.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17, 4713–4730.
- Gordon, C.T., Tan, T.Y., Benko, S., Fitzpatrick, D., Lyonnet, S., and Farlie, P.G. (2009). Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease. *J. Med. Genet.* 46, 649–656.
- Goto, R., Saito, T., Takeda, T., Fujimoto, T., Takagi, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2012). Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. *Dev. Biol.* 370, 98–109.
- Gouédard, L., Chen, Y.G., Thevenet, L., Racine, C., Borie, S., Lamarre, I., Josso, N., Massague, J., and di Clemente, N. (2000). Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 27973–27978.
- Greenstein, B. (1995). The physiology of reproduction 2nd edition 1994 editors-in-chief: ernst knobii, jimmy D. Neill. *Endocr* 3, 313–313.

- Gregoire, E.P., Lavery, R., Chassot, A.-A., Akiyama, H., Treier, M., Behringer, R.R., and Chaboissier, M.-C. (2011). Transient development of ovotestes in XX Sox9 transgenic mice. *Dev. Biol.* 349, 65–77.
- Griswold, M.D., Solari, A., Tung, P.S., and Fritz, I.B. (1977). Stimulation by follicle-stimulating hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from testes of immature rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 7, 151–165.
- Grosschedl, R., Giese, K., and Pagel, J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 10, 94–100.
- Grossman, M.P., Nakajima, S.T., Fallat, M.E., and Siow, Y. (2008). Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil. Steril.* 89, 1364–1370.
- Gruidl, M.E., Smith, P.A., Kuznicki, K.A., McCrone, J.S., Kirchner, J., Roussel, D.L., Strome, S., and Bennett, K.L. (1996). Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13837–13842.
- Grynberg, M., Pierre, A., Rey, R., Leclerc, A., Arouche, N., Hesters, L., Catteau-Jonard, S., Frydman, R., Picard, J.-Y., Fanchin, R., *et al.* (2012). Differential regulation of ovarian anti-müllerian hormone (AMH) by estradiol through α - and β -estrogen receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1649–1657.
- Gu, Z., Reynolds, E.M., Song, J., Lei, H., Feijen, A., Yu, L., He, W., MacLaughlin, D.T., van den Eijnden-van Raaij, J., Donahoe, P.K., *et al.* (1999). The type I serine/threonine kinase receptor ActRIA (ALK2) is required for gastrulation of the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* 126, 2551–2561.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245–250.
- Gudkov, A.V., and Komarova, E.A. (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 117–129.
- Guerrier, D., Tran, D., Vanderwinden, J.M., Hideux, S., Van Outryve, L., Legeai, L., Bouchard, M., Van Vliet, G., De Laet, M.H., and Picard, J.Y. (1989). The persistent Müllerian duct syndrome: a molecular approach. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68, 46–52.
- Guerrier, D., Boussin, L., Mader, S., Josso, N., Kahn, A., and Picard, J.Y. (1990). Expression of the gene for anti-Müllerian hormone. *J. Reprod. Fertil.* 88, 695–706.
- Guigon, C.J., and Magre, S. (2006). Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol. Reprod.* 74, 450–458.
- Guigon, C.J., Coudouel, N., Mazaud-Guittot, S., Forest, M.G., and Magre, S. (2005). Follicular cells acquire sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology* 146, 2992–3004.
- Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., Mcmeel, O.M., Martin, S.A., and Fostier, A. (1999). Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 54, 154–162.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., and Chang, C.-F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 352–366.
- Gustafson, E.A., and Wessel, G.M. (2010). Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 32, 626–637.
- Guth, S.I.E., and Wegner, M. (2008). Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 3000–3018.

Ha, T.U., Segev, D.L., Barbie, D., Masiakos, P.T., Tran, T.T., Dombkowski, D., Glander, M., Clarke, T.R., Lorenzo, H.K., Donahoe, P.K., *et al.* (2000). Mullerian inhibiting substance inhibits ovarian cell growth through an Rb-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 275, 37101–37109.

Hallett, J.S., and Wentworth, B.C. (1991a). The effects of busulfan on gonadal differentiation and development in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poult. Sci.* 70, 1619–1623.

Halm, S., Rocha, A., Miura, T., Prat, F., and Zanuy, S. (2007). Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. *Gene* 388, 148–158.

Handel, M.A., and Eppig, J.J. (1979). Sertoli cell differentiation in the testes of mice genetically deficient in germ cells. *Biol. Reprod.* 20, 1031–1038.

Hanley, N.A., Ball, S.G., Clement-Jones, M., Hagan, D.M., Strachan, T., Lindsay, S., Robson, S., Ostrer, H., Parker, K.L., and Wilson, D.I. (1999). Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech. Dev.* 87, 175–180.

Hanover, J.A., Love, D.C., and Prinz, W.A. (2009). Calmodulin-driven nuclear entry: trigger for sex determination and terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* 284, 12593–12597.

Haqq, C., Lee, M.M., Tizard, R., Wysk, M., DeMarinis, J., Donahoe, P.K., and Cate, R.L. (1992). Isolation of the rat gene for Mullerian inhibiting substance. *Genomics* 12, 665–669.

Harley, V.R., and Goodfellow, P.N. (1994). The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol. Reprod. Dev.* 39, 184–193.

Harley, V.R., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res.* 22, 1500–1501.

Harley, V.R., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., and Hextall, P.J. (1996). The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett.* 391, 24–28.

Harley, V.R., Clarkson, M.J., and Argentaro, A. (2003). The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (*sex-determining region on the Y chromosome*) and SOX9 (*SRY-related high-mobility group (HMG) box 9*). *Endocr. Rev.* 24, 466–487.

Hashimoto, Y., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K., and Inoue, K. (2004). Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Dev. Biol.* 268, 152–161.

Hatano, O., Takayama, K., Imai, T., Waterman, M.R., Takakusu, A., Omura, T., and Morohashi, K. (1994). Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Dev. Camb. Engl.* 120, 2787–2797.

Hattori, R.S., Gould, R.J., Fujioka, T., Saito, T., Kurita, J., Strüssmann, C.A., Yokota, M., and Watanabe, S. (2007). Temperature-dependent sex determination in Hd-rR medaka *Oryzias latipes*: gender sensitivity, thermal threshold, critical period, and DMRT1 expression profile. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* 1, 138–146.

Hattori, R.S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S.K., Sakamoto, T., Fernandino, J.I., Somoza, G.M., Yokota, M., and Strüssmann, C.A. (2012). A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2955–2959.

Hattori, T., Eberspaecher, H., Lu, J., Zhang, R., Nishida, T., Kahyo, T., Yasuda, H., and Crombrugghe, B. de (2006). Interactions between PIAS Proteins and SOX9 Result in an Increase in the Cellular Concentrations of SOX9. *J. Biol. Chem.* 281, 14417–14428.

Hattori, T., Coustry, F., Stephens, S., Eberspaecher, H., Takigawa, M., Yasuda, H., and de Crombrugghe, B. (2008). Transcriptional regulation of chondrogenesis by coactivator Tip60 *via* chromatin association with Sox9 and Sox5. *Nucleic Acids Res.* 36, 3011–3024.

Hay, B., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1988). A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55, 577–587.

Hay, B., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1990). Localization of vasa, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Dev. Camb. Engl.* 109, 425–433.

Hayashi, M., Shima, H., Hayashi, K., Trelstad, R.L., and Donahoe, P.K. (1984). Immunocytochemical localization of Mullerian inhibiting substance in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in Sertoli cells of the neonatal calf testis using a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 32, 649–654.

Hayes, T.B. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J. Exp. Zool.* 281, 373–399.

Hemsworth, B.N., and Jackson, H. (1962). Effect of “busulphan” on the foetal gonad. *Nature* 195, 816–817.

Hemsworth, B.N., and Jackson, H. (1963a). Effect of Busulphan on the developing gonad of the male rat. *J. Reprod. Fertil.* 5, 187–194.

Hemsworth, B.N., and JACKSON, H. (1963b). Effect of busulphan on the developing ovary in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 6, 229–233.

Hickford, D.E., Frankenberg, S., Pask, A.J., Shaw, G., and Renfree, M.B. (2011). DDX4 (VASA) is conserved in germ cell development in marsupials and monotremes. *Biol. Reprod.* 85, 733–743.

Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S., and Aiso, S. (1998). The mouse Sox5 gene encodes a protein containing the leucine zipper and the Q box. *Biochim. Biophys. Acta* 1399, 40–46.

Hirobe, S., He, W.W., Lee, M.M., and Donahoe, P.K. (1992). Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology* 131, 854–862.

Hirobe, S., He, W.W., Gustafson, M.L., MacLaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (1994). Müllerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection. *Biol. Reprod.* 50, 1238–1243.

von Hofsten, J., Larsson, A., and Olsson, P.E. (2005). Novel steroidogenic factor-1 homolog (ff1d) is coexpressed with anti-Müllerian hormone (AMH) in zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 233, 595–604.

Hong, C.-S., and Saint-Jeannet, J.-P. (2005). Sox proteins and neural crest development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 694–703.

van Houten, E.L.A.F., Themmen, A.P.N., and Visser, J.A. (2010). Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann. Endocrinol.* 71, 191–197.

Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., *et al.* (2007). A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* 129, 69–82.

Huang, B., Wang, S., Ning, Y., Lamb, A.N., and Bartley, J. (1999). Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am. J. Med. Genet.* 87, 349–353.

Huang, P., Zhu, Z., Lin, S., and Zhang, B. (2012). Reverse genetic approaches in zebrafish. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 39, 421–433.

Huang, S., Tang, B., Usoskin, D., Lechleider, R.J., Jamin, S.P., Li, C., Anzano, M.A., Ebendal, T., Deng, C., and Roberts, A.B. (2002). Conditional knockout of the *Smad1* gene. *Genes. New York N* 2000 32, 76–79.

- Huang, W., Zhou, X., Lefebvre, V., and de Crombrughe, B. (2000). Phosphorylation of SOX9 by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase A Enhances SOX9's Ability To Transactivate a Col2a1 Chondrocyte-Specific Enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4149–4158.
- Hudson, P.L., Douglas, I., Donahoe, P.K., Cate, R.L., Epstein, J., Pepinsky, R.B., and MacLaughlin, D.T. (1990). An immunoassay to detect human müllerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 16–22.
- Hutson, J., Ikawa, H., and Donahoe, P.K. (1981). The ontogeny of Mullerian inhibiting substance in the gonads of the chicken. *J. Pediatr. Surg.* 16, 822–827.
- Hyde, D.R., Godwin, A.R., and Thummel, R. (2012). *In vivo* electroporation of morpholinos into the regenerating adult zebrafish tail fin. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D.-S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M., and Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod.* 78, 333–341.
- Ikeda, Y., Shen, W.H., Ingraham, H.A., and Parker, K.L. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 8, 654–662.
- Ikenishi, K., and Tanaka, T.S. (1997). Involvement of the protein of *Xenopus* vasa homolog (*Xenopus vasa-like gene 1*, XVLG1) in the differentiation of primordial germ cells. *Dev. Growth Differ.* 39, 625–633.
- Ikenishi, K., and Tanaka, T.S. (2000). Spatio-temporal expression of *Xenopus* vasa homolog, XVLG1, in oocytes and embryos: the presence of XVLG1 RNA in somatic cells as well as germline cells. *Dev. Growth Differ.* 42, 95–103.
- Ikenishi, K., Tanaka, T.S., and Komiya, T. (1996). Spatio-temporal distribution of the protein of *Xenopus* vasa homologue (*Xenopus vasa-like gene 1*, XVLG1) in embryos. *Dev. Growth Differ.* 38, 527–535.
- Imbeaud, S., Faure, E., Lamarre, I., Mattéi, M.G., di Clemente, N., Tizard, R., Carré-Eusèbe, D., Belville, C., Trageihon, L., Tonkin, C., *et al.* (1995). Insensitivity to anti-müllerian hormone due to a mutation in the human anti-müllerian hormone receptor. *Nat. Genet.* 11, 382–388.
- Imbeaud, S., Belville, C., Messika-Zeitoun, L., Rey, R., Clemente, N. di, Josso, N., and Picard, J.-Y. (1996). A 27 Base-Pair Deletion of the Anti-Müllerian Type Ii Receptor Gene is the Most Common Cause of the Persistent Müllerian Duct Syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1269–1277.
- Ingraham, H.A., Hirokawa, Y., Roberts, L.M., Mellon, S.H., McGee, E., Nachtigal, M.W., and Visser, J.A. (2000). Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.* 55, 53–67; discussion 67–68.
- Iovane, A., Aumas, C., and de Roux, N. (2004). New insights in the genetics of isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 151 Suppl 3, U83–88.
- Iwade, R., Maruo, K., Okada, G., and Nakamura, M. (2008). Elevated expression of P450c17 (CYP17) during testicular formation in the frog. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 79–87.
- Jakob, S., and Lovell-Badge, R. (2011). Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. *FEBS J.* 278, 1002–1009.
- Jamin, S. (2010). L'hormone anti-müllerienne : signalisation et récepteurs de type I et II (Clamart, France).
- Jamin, S.P., Arango, N.A., Mishina, Y., Hanks, M.C., and Behringer, R.R. (2002). Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat. Genet.* 32, 408–410.
- Jiang, T., Hou, C.-C., She, Z.-Y., and Yang, W.-X. (2013). The SOX gene family: function and regulation in testis determination and male fertility maintenance. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2187–2194.

- Johnson, A.D., Drum, M., Bachvarova, R.F., Masi, T., White, M.E., and Crother, B.I. (2003). Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution. *Evol. Dev.* 5, 414–431.
- Johnson, P.A., Kent, T.R., Urick, M.E., and Giles, J.R. (2008). Expression and regulation of anti-mullerian hormone in an oviparous species, the hen. *Biol. Reprod.* 78, 13–19.
- Johnson, P.A., Kent, T.R., Urick, M.E., Trevino, L.S., and Giles, J.R. (2009). Expression of anti-Mullerian hormone in hens selected for different ovulation rates. *Reprod. Camb. Engl.* 137, 857–863.
- Joly, J. (1966). Sur l'éthologie sexuelle de *Salamandra salamandra* (L.). *Z. Für Tierpsychol.* 23, 8–27.
- Josso, N. (1970). Action of human testis on rat fetus Muller's duct in organ culture. *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci. Série Sci. Nat.* 271, 2149–2152.
- Josso, N. (2008). Professor Alfred Jost: the builder of modern sex differentiation. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 2, 55–63.
- Josso, N. (2011). Biology and Genetics of Anti-Müllerian Hormone. In *Hormonal and Genetic Basis of Sexual Differentiation Disorders and Hot Topics in Endocrinology: Proceedings of the 2nd World Conference*, M.I. New, and J.L. Simpson, eds. (Springer New York), pp. 83–85.
- Josso, N., and di Clemente, N. (2003). Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 14, 91–97.
- Josso, N., and di Clemente (1999). TGF-beta Family Members and Gonadal Development. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 10, 216–222.
- Josso, N., Picard, J.Y., Dacheux, J.L., and Courot, M. (1979). Detection of anti-Müllerian activity in boar rete testis fluid. *J. Reprod. Fertil.* 57, 397–400.
- Josso, N., Cate, R.L., Picard, J.Y., Vigier, B., di Clemente, N., Wilson, C., Imbeaud, S., Pepinsky, R.B., Guerrier, D., and Boussin, L. (1993). Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog. Horm. Res.* 48, 1–59.
- Josso, N., Racine, C., di Clemente, N., Rey, R., and Xavier, F. (1998). The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 3–7.
- Josso, N., di Clemente, N., and Gouédard, L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179, 25–32.
- Josso, N., Belville, C., di Clemente, N., and Picard, J.-Y. (2005). AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. *Hum. Reprod. Update* 11, 351–356.
- Jost, A. (1947). Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Microsc Morph Exp* 36, 271–315.
- Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Progr Horm Res* 8, 379–418.
- Jost, A., Vigier, B., and Prepin, J. (1972). Freemartins in Cattle: The First Steps of Sexual Organogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 29, 349–379.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., and Smith, A.E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33–38.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., and Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet. TIG* 16, 182–187.
- Kanai, Y., Hiramatsu, R., Matoba, S., and Kidokoro, T. (2005). From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *J. Biochem. (Tokyo)* 138, 13–19.

- Kashimada, K., and Koopman, P. (2010). Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3921–3930.
- Kawano, K., Miura, I., Morohashi, K., Takase, M., and Nakamura, M. (1998). Molecular cloning and expression of the SF-1/Ad4BP gene in the frog, *Rana rugosa*. *Gene* 222, 169–176.
- Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J.E., Sinclair, A.H., and Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Dev. Camb. Engl.* 122, 2813–2822.
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 4, e187.
- Kim, Y., Bingham, N., Sekido, R., Parker, K.L., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2007). Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16558–16563.
- King, T.R., Lee, B.K., Behringer, R.R., and Eicher, E.M. (1991). Mapping anti-müllerian hormone (Amh) and related sequences in the mouse: identification of a new region of homology between MMU10 and HSA19p. *Genomics* 11, 273–283.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., and Abe, S.I. (1999). Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.* 23, 167–176.
- Kito, G., Aramaki, S., Tanaka, K., Soh, T., Yamauchi, N., and Hattori, M. (2010). Temporal and spatial differential expression of chicken germline-specific proteins cDAZL, CDH and CVH during gametogenesis. *J. Reprod. Dev.* 56, 341–346.
- Klüver, N., Kondo, M., Herpin, A., Mitani, H., and Schartl, M. (2005). Divergent expression patterns of Sox9 duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. *Dev. Genes Evol.* 215, 297–305.
- Klüver, N., Pfennig, F., Pala, I., Storch, K., Schlieder, M., Froschauer, A., Gutzeit, H.O., and Schartl, M. (2007). Differential expression of anti-Müllerian hormone (amh) and anti-Müllerian hormone receptor type II (amhrII) in the teleost medaka. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 271–281.
- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., and Nüsslein-Volhard, C. (2000). Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* 149, 875–888.
- Ko, C.-I., Chesnel, A., Mazerbourg, S., Kuntz, S., Flament, S., and Chardard, D. (2008). Female-enriched expression of ERalpha during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 234–245.
- Kobayashi, A., and Behringer, R.R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 4, 969–980.
- Kobayashi, A., Chang, H., Chaboissier, M.-C., Schedl, A., and Behringer, R.R. (2005). Sox9 in testis determination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1061, 9–17.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., and Nagahama, Y. (2000). Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Dev.* 99, 139–142.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., and Nagahama, Y. (2002). Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mech. Dev.* 111, 167–171.

- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G., and Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9a during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 297–306.
- Kobayashi, Y., Nagahama, Y., and Nakamura, M. (2013). Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* 7, 115–125.
- Kocer, A., Reichmann, J., Best, D., and Adams, I.R. (2009). Germ cell sex determination in mammals. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 205–213.
- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K., and Furusawa, M. (1994). Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 162, 354–363.
- Kondo, M., Nanda, I., Hornung, U., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Schmid, M., Shima, A., and Scharl, M. (2003). Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of medaka from other fish species. *Curr. Biol. CB* 13, 416–420.
- Kondo, M., Nanda, I., Schmid, M., and Scharl, M. (2009). Sex determination and sex chromosome evolution: insights from medaka. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* 3, 88–98.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351, 117–121.
- Koopman, P., Schepers, G., Brenner, S., and Venkatesh, B. (2004). Origin and diversity of the SOX transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes*. *Gene* 328, 177–186.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2001). A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* 15, 2877–2885.
- Krøvel, A.V., and Olsen, L.C. (2002). Expression of a *vas::EGFP* transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech. Dev.* 116, 141–150.
- Krøvel, A.V., and Olsen, L.C. (2004). Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development. *Dev. Biol.* 271, 190–197.
- Kuntz, S., Chardard, D., Chesnel, A., Grillier-Vuissoz, I., and Flament, S. (2003a). Steroids, aromatase and sex differentiation of the newt *Pleurodeles waltl*. *Cytogenet. Genome Res.* 101, 283–288.
- Kuntz, S., Chesnel, A., Duterque-Coquillaud, M., Grillier-Vuissoz, I., Callier, M., Dournon, C., Flament, S., and Chardard, D. (2003b). Differential expression of P450 aromatase during gonadal sex differentiation and sex reversal of the newt *Pleurodeles waltl*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 89–100.
- Kuntz, S., Chardard, D., Ko, C.-I., Dumond, H., Ducatez, M., Callier, M., Flament, S., and Chesnel, A. (2006). Female-enriched and thermosensitive expression of steroidogenic factor-1 during gonadal differentiation in *Pleurodeles waltl*. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 175–186.
- Kurokawa, H., Saito, D., Nakamura, S., Katoh-Fukui, Y., Ohta, K., Baba, T., Morohashi, K., and Tanaka, M. (2007). Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16958–16963.
- Kuznicki, K.A., Smith, P.A., Leung-Chiu, W.M., Estevez, A.O., Scott, H.C., and Bennett, K.L. (2000). Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2907–2916.
- Lacroix, J.C. (1968). Etude descriptive des chromosomes en écouvillon dans le genre *Pleurodèles*. *Ann.Emb.Morph.* 1, : 179–202.

- Lacroix, J.C., Azzouz, R., Boucher, D., Abbadie, C., Pyne, C.K., and Charlemagne, J. (1985). Monoclonal antibodies to lampbrush chromosome antigens of *Pleurodeles waltlii*. *Chromosoma* 92, 69–80.
- Lacroix, J.C., Azzouz, R., Simon, F., Bellini, M., Charlemagne, J., and Dournon, C. (1990). Lampbrush W and Z heterochromosome characterization with a monoclonal antibody and heat-induced chromosomal markers in the newt *Pleurodeles waltli*: W chromosome plays a role in female sex determination. *Chromosoma* 99, 307–314.
- Lang-Muritano, M., Biason-Lauber, A., Gitzelmann, C., Belville, C., Picard, Y., and Schoenle, E.J. (2001). A novel mutation in the anti-müllerian hormone gene as cause of persistent müllerian duct syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 160, 652–654.
- Lasala, C., Schteingart, H.F., Arouche, N., Bedecarrás, P., Grinspon, R.P., Picard, J.-Y., Josso, N., di Clemente, N., and Rey, R.A. (2011). SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Müllerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E539–547.
- Lasko, P.F., and Ashburner, M. (1988). The product of the *Drosophila* gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335, 611–617.
- Lasko, P.F., and Ashburner, M. (1990). Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev.* 4, 905–921.
- Laudet, V., Stehelin, D., and Clevers, H. (1993). Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res.* 21, 2493–2501.
- Lavery, R., Lardenois, A., Ranc-Jianmotamedi, F., Pauper, E., Gregoire, E.P., Vigier, C., Moreilhon, C., Primig, M., and Chaboissier, M.-C. (2011). XY Sox9 embryonic loss-of-function mouse mutants show complete sex reversal and produce partially fertile XY oocytes. *Dev. Biol.* 354, 111–122.
- Lee, M.M., Donahoe, P.K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G.B., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R.A., Schoenfeld, D., and MacLaughlin, D.T. (1996). Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 571–576.
- Lee, M.M., Seah, C.C., Masiakos, P.T., Sottas, C.M., Preffer, F.I., Donahoe, P.K., MacLaughlin, D.T., and Hardy, M.P. (1999). Müllerian-inhibiting substance type II receptor expression and function in purified rat Leydig cells. *Endocrinology* 140, 2819–2827.
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., Han, Y., and Pallavi, B. (2007). Control of Cell Fate and Differentiation by Sry-related High-mobility-group Box (Sox) Transcription Factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 2195–2214.
- Leroy, P., Alzari, P., Sassoon, D., Wolgemuth, D., and Fellous, M. (1989). The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase. *Cell* 57, 549–559.
- Liang, L., Diehl-Jones, W., and Lasko, P. (1994). Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Dev. Camb. Engl.* 120, 1201–1211.
- Linder, P. (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* 34, 4168–4180.
- Linder, P., and Lasko, P. (2006). Bent out of shape: RNA unwinding by the DEAD-box helicase Vasa. *Cell* 125, 219–221.
- Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P.P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121–122.
- Lo, R.S., Chen, Y.G., Shi, Y., Pavletich, N.P., and Massagué, J. (1998). The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J.* 17, 996–1005.

- Lukas-Croisier, C., Lasala, C., Nicaud, J., Bedecarrás, P., Kumar, T.R., Dutertre, M., Matzuk, M.M., Picard, J.-Y., Josso, N., and Rey, R. (2003). Follicle-stimulating hormone increases testicular Anti-Müllerian hormone (AMH) production through sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH Gene. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 550–561.
- Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481–490.
- Lutz, M., and Knaus, P. (2002). Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell. Signal.* 14, 977–988.
- Lyet, L., Louis, F., Forest, M.G., Josso, N., Behringer, R.R., and Vigier, B. (1995). Ontogeny of reproductive abnormalities induced by deregulation of anti-müllerian hormone expression in transgenic mice. *Biol. Reprod.* 52, 444–454.
- Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Méjean, C., Berta, P., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J.* 24, 1798–1809.
- Malki, S., Boizet-Bonhoure, B., and Poulat, F. (2010). Shuttling of SOX proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 411–416.
- Marracci, S., Casola, C., Bucci, S., Ragghianti, M., Ogielska, M., and Mancino, G. (2007). Differential expression of two vasa/PL10-related genes during gametogenesis in the special model system *Rana*. *Dev. Genes Evol.* 217, 395–402.
- Marsh, J.C. (1976). The effects of cancer chemotherapeutic agents on normal hematopoietic precursor cells: a review. *Cancer Res.* 36, 1853–1882.
- Marshall, O.J., and Harley, V.R. (2001). Identification of an interaction between SOX9 and HSP70. *FEBS Lett.* 496, 75–80.
- Maruo, K., Suda, M., Yokoyama, S., Oshima, Y., and Nakamura, M. (2008). Steroidogenic gene expression during sex determination in the frog *Rana rugosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 87–94.
- Masiakos, P.T., MacLaughlin, D.T., Maheswaran, S., Teixeira, J., Fuller, A.F., Shah, P.C., Kehas, D.J., Kenneally, M.K., Dombkowski, D.M., Ha, T.U., *et al.* (1999). Human Ovarian Cancer, Cell Lines, and Primary Ascites Cells Express the Human Müllerian Inhibiting Substance (MIS) Type II Receptor, Bind, and Are Responsive to MIS. *Clin. Cancer Res.* 5, 3488–3499.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753–791.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178.
- Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215–230.
- Massagué, J. (2012). TGFβ signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–630.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783–2810.
- Matson, C.K., and Zarkower, D. (2012). Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat. Rev. Genet.* 13, 163–174.
- Matsuda, M., Matsuda, C., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (1998). Identification of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 82, 257–262.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., *et al.* (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563.

- Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2003). *Oryzias latipes* Has DMY, a Gene That Is Required for Male Development in the Medaka, *O. latipes*. *Zoolog. Sci.* 20, 159–161.
- Matsuda, M., Shinomiya, A., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., and Nagahama, Y. (2007). DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3865–3870.
- Matsumoto, Y., and Crews, D. (2012). Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 103–110.
- Maufroid, J.P., and Capuron, A. (1973). Experimental demonstration of germinal cells in the presumptive lateral mesoderm of the young gastrula of *Pleurodeles waltii* (urodele amphibian). *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci. Série Sci. Nat.* 676, 821–824.
- Maufroid, J.P., and Capuron, A. (1977a). Induction of the mesoderm and primordial germ cells by the endoderm of *Pleurodeles waltii* (Amphibia, Urodele): development during gastrulation. *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci. Série Sci. Nat.* 284, 1713–1716.
- Maufroid, J.P., and Capuron, A. (1977b). Recent researches on primordial germ cells of *Pleurodeles waltii* (Amphibia, Urodele). *Memoires Soc. Zool. Fr.* 41, 43–60.
- Maurizii, M.G., Cavaliere, V., Gamberi, C., Lasko, P., Gargiulo, G., and Taddei, C. (2009). Vasa protein is localized in the germ cells and in the oocyte-associated pyriform follicle cells during early oogenesis in the lizard *Podarcis sicula*. *Dev. Genes Evol.* 219, 361–367.
- Mayer, L.P., Overstreet, S.L., Dyer, C.A., and Propper, C.R. (2002). Sexually dimorphic expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) in developing gonads of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127, 40–47.
- Mazaud, S., Guigon, C.J., Lozach, A., Coudouel, N., Forest, M.G., Coffigny, H., and Magre, S. (2002). Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 143, 4775–4787.
- Mazaud Guitot, S., Guigon, C.J., Coudouel, N., and Magre, S. (2006). Consequences of fetal irradiation on follicle histogenesis and early follicle development in rat ovaries. *Biol. Reprod.* 75, 749–759.
- Mazen, I., Abdel Hamid, M.S., El-Gammal, M., Aref, A., and Amr, K. (2011). AMH gene mutations in two Egyptian families with persistent müllerian duct syndrome. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 5, 277–280.
- McCarrey, J.R., and Abbott, U.K. (1978). Chick gonad differentiation following excision of primordial germ cells. *Dev. Biol.* 66, 256–265.
- McCarrey, J.R., and Abbott, U.K. (1982). Functional differentiation of chick gonads following depletion of primordial germ cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 68, 161–174.
- McClelland, K., Bowles, J., and Koopman, P. (2012). Male sex determination: insights into molecular mechanisms. *Asian J. Androl.* 14, 164–171.
- McDowall, S., Argentaro, A., Ranganathan, S., Weller, P., Mertin, S., Mansour, S., Tolmie, J., and Harley, V. (1999). Functional and Structural Studies of Wild Type SOX9 and Mutations Causing Campomelic Dysplasia. *J. Biol. Chem.* 274, 24023–24030.
- McGee, E.A., and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21, 200–214.
- McLaren, A. (1991). Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 13, 151–156.

- McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 262, 1–15.
- Menabò, S., Balsamo, A., Nicoletti, A., Gennari, M., Pirazzoli, P., Cicognani, A., and Baldazzi, L. (2008). Three novel AMH gene mutations in a patient with persistent müllerian duct syndrome and normal AMH serum dosage. *Horm. Res.* 70, 124–128.
- Merchant, H. (1975). Rat gonadal and ovarioan organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev. Biol.* 44, 1–21.
- Merchant-Larios, H., and Coello, J. (1979). The effect of busulfan on rat primordial germ cells at the ultrastructural level. *Cell Differ.* 8, 145–155.
- Merchant-Larios, H., and Centeno, B. (1981). Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. *Prog. Clin. Biol. Res.* 59B, 383–392.
- Merchant-Larios, H., and Díaz-Hernández, V. (2013). Environmental sex determination mechanisms in reptiles. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 7, 95–103.
- Messika-Zeitoun, L., Gouédard, L., Belville, C., Dutertre, M., Lins, L., Imbeaud, S., Hughes, I.A., Picard, J.-Y., Josso, N., and Clemente, N. di (2001). Autosomal Recessive Segregation of a Truncating Mutation of Anti-Müllerian Type II Receptor in a Family Affected by the Persistent Müllerian Duct Syndrome Contrasts with Its Dominant Negative Activity *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4390–4397.
- Miller, W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9, 295–318.
- Miller, C., and Sassoon, D.A. (1998). Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Dev. Camb. Engl.* 125, 3201–3211.
- Mintz, B., and Russell, E.S. (1957). Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J. Exp. Zool.* 134, 207–237.
- Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N., and Behringer, R.R. (1995). Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 9, 3027–3037.
- Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M.J., Matzuk, M.M., Josso, N., Cate, R.L., and Behringer, R.R. (1996). Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* 10, 2577–2587.
- Mishina, Y., Tizard, R., Deng, J.M., Pathak, B.G., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Cate, R.L., and Behringer, R.R. (1997). Sequence, genomic organization, and chromosomal location of the mouse Müllerian-inhibiting substance type II receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 741–746.
- Mishina, Y., Whitworth, D.J., Racine, C., and Behringer, R.R. (1999). High specificity of Müllerian-inhibiting substance signaling *in vivo*. *Endocrinology* 140, 2084–2088.
- Mishina, Y., Hanks, M.C., Miura, S., Tallquist, M.D., and Behringer, R.R. (2002). Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genes. New York N* 2000 32, 69–72.
- Miura, I. (2007). An evolutionary witness: the frog *Rana rugosa* underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 1, 323–331.
- Miura, I., Ohtani, H., and Ogata, M. (2012). Independent degeneration of W and Y sex chromosomes in frog *Rana rugosa*. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 20, 47–55.
- Miura, T., Miura, C., Konda, Y., and Yamauchi, K. (2002). Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2689–2697.
- Mochizuki, K., Nishimiya-Fujisawa, C., and Fujisawa, T. (2001). Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. *Dev. Genes Evol.* 211, 299–308.

- Modi, W.S., and Crews, D. (2005). Sex chromosomes and sex determination in reptiles. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 660–665.
- Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., Marzi, L., Cohen-Solal, A., Georg, I., Klatzig, J., *et al.* (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 136, 1813–1821.
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V.R., and Merchant-Larios, H. (1999). Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures. *J. Exp. Zool.* 284, 705–710.
- Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., and Kondoh, H. (2007). The hotei mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 9691–9696.
- Morrish, B.C., and Sinclair, A.H. (2002). Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reprod. Camb. Engl.* 124, 447–457.
- Mueller, T.D., and Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* 586, 1846–1859.
- Münsterberg, A., and Lovell-Badge, R. (1991). Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 113, 613–624.
- Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2012). Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* 191, 163–170.
- Nachtigal, M.W., and Ingraham, H.A. (1996). Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7711–7716.
- Nachtigal, M.W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D.L., Flanagan, J.N., Hammer, G.D., and Ingraham, H.A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93, 445–454.
- Nakamoto, M., Suzuki, A., Matsuda, M., Nagahama, Y., and Shibata, N. (2005). Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 729–736.
- Nakamura, M. (2009). Sex determination in amphibians. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 271–282.
- Nakamura, M. (2010). The mechanism of sex determination in vertebrates-are sex steroids the key-factor? *J. Exp. Zool. Part Ecol. Genet. Physiol.* 313, 381–398.
- Nakamura, M. (2013). Is a sex-determining gene(s) necessary for sex-determination in amphibians? Steroid hormones may be the key factor. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 7, 104–114.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.-T., and Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 281, 362–372.
- Nakamura, S., Kobayashi, D., Aoki, Y., Yokoi, H., Ebe, Y., Wittbrodt, J., and Tanaka, M. (2006). Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos. *Dev. Biol.* 295, 678–688.
- Nakamura, S., Aoki, Y., Saito, D., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., and Tanaka, M. (2008). Sox9b/sox9a2-EGFP transgenic medaka reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 472–476.

- Nakamura, S., Watakabe, I., Nishimura, T., Picard, J.-Y., Toyoda, A., Taniguchi, Y., di Clemente, N., and Tanaka, M. (2012a). Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti-Müllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Dev. Camb. Engl.* 139, 2283–2287.
- Nakamura, Y., Usui, F., Atsumi, Y., Otomo, A., Teshima, A., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H., and Tagami, T. (2009). Effects of busulfan sustained-release emulsion on depletion and repopulation of primordial germ cells in early chicken embryos. *J. Poult. Sci.* 46, 127–135.
- Nakamura, Y., Usui, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H., and Tagami, T. (2010). Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biol. Reprod.* 83, 130–137.
- Nakamura, Y., Usui, F., Miyahara, D., Mori, T., Ono, T., Kagami, H., Takeda, K., Nirasawa, K., and Tagami, T. (2012b). X-irradiation removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGCs in chimeric chickens. *J. Reprod. Dev.* 58, 432–437.
- Nakamura, Y., Kagami, H., and Tagami, T. (2013). Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Dev. Growth Differ.* 55, 20–40.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., *et al.* (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11778–11783.
- Neeper, M., Lowe, R., Galuska, S., Hofmann, K.J., Smith, R.G., and Elbrecht, A. (1996). Molecular cloning of an avian anti-Müllerian hormone homologue. *Gene* 176, 203–209.
- Ng, L.J., Wheatley, S., Muscat, G.E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D.M., Tam, P.P., Cheah, K.S., and Koopman, P. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 183, 108–121.
- Nicol, B. (2011). Caractérisation de la voie Wnt/ β -caténine durant la différenciation gonadique chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*. Thèse de l'Université Rennes 1.
- Nishi, M.Y., Domenice, S., Maciel-Guerra, A.T., Zaba Neto, A., Silva, M.A.C.P. da, Costa, E.M.F., Guerra-Junior, G., and Mendonça, B.B. de (2012). Analysis of anti-Müllerian hormone (AMH) and its receptor (AMHR2) genes in patients with persistent Müllerian duct syndrome. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 56, 473–478.
- Noce, T., Okamoto-Ito, S., and Tsunekawa, N. (2001). Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct. Funct.* 26, 131–136.
- Noll, A., Ruppenthal, S.L., and Montenarh, M. (2006). The mitotic phosphatase cdc25C at the Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 825–830.
- Norris, D.O., Carr, J.A., Summers, C.H., and Featherston, R. (1997). Interactions of androgens and estradiol on sex accessory ducts of larval tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 348–355.
- Notarnicola, C., Malki, S., Berta, P., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2006). Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene Expr. Patterns* 6, 695–702.
- O'Neill, M., Binder, M., Smith, C., Andrews, J., Reed, K., Smith, M., Millar, C., Lambert, D., and Sinclair, A. (2000). ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev. Genes Evol.* 210, 243–249.
- O'Shaughnessy, P.J., Fleming, L., Baker, P.J., Jackson, G., and Johnston, H. (2003). Identification of developmentally regulated genes in the somatic cells of the mouse testis using serial analysis of gene expression. *Biol. Reprod.* 69, 797–808.
- O'Shaughnessy, P.J., Hu, L., and Baker, P.J. (2008). Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells. *Reprod. Camb. Engl.* 135, 839–850.

- Oh, H.J., Kido, T., and Lau, Y.-F.C. (2007). PIAS1 interacts with and represses SOX9 transactivation activity. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1446–1455.
- Olsen, L.C., Aasland, R., and Fjose, A. (1997). A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* 66, 95–105.
- Oreal, E., Pieau, C., Mattei, M.G., Josso, N., Picard, J.Y., Carré-Eusèbe, D., and Magre, S. (1998). Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 212, 522–532.
- Oréal, E., Mazaud, S., Picard, J.-Y., Magre, S., and Carré-Eusèbe, D. (2002). Different patterns of anti-Müllerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 225, 221–232.
- Orth, J.M. (1984). The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 115, 1248–1255.
- Orvis, G.D., and Behringer, R.R. (2007). Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. *Dev. Biol.* 306, 493–504.
- Orvis, G.D., Jamin, S.P., Kwan, K.M., Mishina, Y., Kaartinen, V.M., Huang, S., Roberts, A.B., Umans, L., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., *et al.* (2008). Functional redundancy of TGF-beta family type I receptors and receptor-smads in mediating anti-müllerian hormone-induced müllerian duct regression in the mouse. *Biol. Reprod.* 78, 994–1001.
- Osaki, E., Nishina, Y., Inazawa, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Ohsugi, M., Tezuka, T., Yoshida, M., and Semba, K. (1999). Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nucleic Acids Res.* 27, 2503–2510.
- Osawa, N., Oshima, Y., and Nakamura, M. (2005). Molecular cloning of Dmrt1 and its expression in the gonad of *Xenopus*. *Zoolog. Sci.* 22, 681–687.
- Pala, I., Klüver, N., Thorsteinsdóttir, S., Scharl, M., and Coelho, M.M. (2008). Expression pattern of anti-Müllerian hormone (amh) in the hybrid fish complex of *Squalius alburnoides*. *Gene* 410, 249–258.
- Pangas, S.A., Li, X., Umans, L., Zwijsen, A., Huylebroeck, D., Gutierrez, C., Wang, D., Martin, J.F., Jamin, S.P., Behringer, R.R., *et al.* (2008). Conditional Deletion of Smad1 and Smad5 in Somatic Cells of Male and Female Gonads Leads to Metastatic Tumor Development in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 28, 248–257.
- Park, K.J., Kang, S.J., Kim, T.M., Lee, Y.M., Lee, H.C., Song, G., and Han, J.Y. (2010). Gamma-irradiation depletes endogenous germ cells and increases donor cell distribution in chimeric chickens. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 46, 828–833.
- Parker, K.L., Rice, D.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Wong, M., Bakke, M., Zhao, L., Frigeri, C., Hanley, N.A., *et al.* (2002). Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 19–36.
- Parma, P., and Radi, O. (2012). Molecular mechanisms of sexual development. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 6, 7–17.
- Parr, B.A., and McMahon, A.P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* 395, 707–710.
- Park, K.J., Kang, S.J., Kim, T.M., Lee, Y.M., Lee, H.C., Song, G., and Han, J.Y. (2010). Gamma-irradiation depletes endogenous germ cells and increases donor cell distribution in chimeric chickens. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 46, 828–833.
- Pask, A.J., Harry, J.L., Graves, J.A.M., O'Neill, R.J.W., Layfield, S.L., Shaw, G., and Renfree, M.B. (2002). SOX9 has both conserved and novel roles in marsupial sexual differentiation. *Genes*. New York N 2000 33, 131–139.

- Pause, A., and Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* *11*, 2643–2654.
- Pause, A., Methot, N., and Sonenberg, N. (1993). The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6789–6798.
- Pawlik, T.M., and Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *59*, 928–942.
- Penrad-Mobayed, M., Moreau, N., and Angelier, N. (1998). Evidence for specific RNA/protein interactions in the differential segment of the W sex chromosome in the amphibian *Pleurodeles waltl*. *Dev. Growth Differ.* *40*, 147–156.
- Pevny, L.H., and Lovell-Badge, R. (1997). Sox genes find their feet. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *7*, 338–344.
- Picard, J.Y., and Josso, N. (1984). Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol. Cell. Endocrinol.* *34*, 23–29.
- Picard, J.Y., Benarous, R., Guerrier, D., Josso, N., and Kahn, A. (1986). Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 5464–5468.
- Picon, R. (1969). Action du testicule foetal sur le développement *in vitro* des canaux de Müller chez le rat. *Arch Anat Microsc Morph Exp* *58*, 1–19.
- Pieau, C. (1996). Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* *18*, 19–26.
- Pierantoni, R., Cobellis, G., Meccariello, R., Palmiero, C., Fienga, G., Minucci, S., and Fasano, S. (2002). The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *132*, 131–139.
- Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., and González, A. (2005). Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Gen. Comp. Endocrinol.* *142*, 102–110.
- Piprek, R.P., Pecio, A., Kubiak, J.Z., and Szymura, J.M. (2012). Differential effects of testosterone and 17 β -estradiol on gonadal development in five anuran species. *Reprod. Camb. Engl.* *144*, 257–267.
- Polanco, J.C., Wilhelm, D., Davidson, T.-L., Knight, D., and Koopman, P. (2010). Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 506–516.
- Ponti, M., Souhami, R.L., Fox, B.W., and Hartley, J.A. (1991). DNA interstrand crosslinking and sequence selectivity of dimethanesulphonates. *Br. J. Cancer* *63*, 743–747.
- Poonlaphdecha, S., Pepey, E., Huang, S.-H., Canonne, M., Soler, L., Mortaji, S., Morand, S., Pfennig, F., Mélard, C., Baroiller, J.F., *et al.* (2011). Elevated amh gene expression in the brain of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* *5*, 33–47.
- Poulat, F., de Santa Barbara, P., Desclozeaux, M., Soullier, S., Moniot, B., Bonneaud, N., Boizet, B., and Berta, P. (1997). The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* *272*, 7167–7172.
- Preiss, S., Argentaro, A., Clayton, A., John, A., Jans, D.A., Ogata, T., Nagai, T., Barroso, I., Schafer, A.J., and Harley, V.R. (2001). Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* *276*, 27864–27872.

- Pritchett, J., Athwal, V., Roberts, N., Hanley, N.A., and Hanley, K.P. (2011). Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: lessons from development. *Trends Mol. Med.* 17, 166–174.
- Quigley, C.A., De Bellis, A., Marschke, K.B., el-Awady, M.K., Wilson, E.M., and French, F.S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr. Rev.* 16, 271–321.
- Quinn, A.E., Georges, A., Sarre, S.D., Guarino, F., Ezaz, T., and Graves, J.A.M. (2007). Temperature Sex Reversal Implies Sex Gene Dosage in a Reptile. *Science* 316, 411–411.
- Racine, C., Rey, R., Forest, M.G., Louis, F., Ferré, A., Huhtaniemi, I., Josso, N., and di Clemente, N. (1998). Receptors for anti-müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 594–599.
- Racine, C., Pask, A.J., Wijayanti, G.E., di Clemente, N., Picard, J.-Y., Shaw, G., Renfree, M.B., and Josso, N. (2009). Early expression of the androgen receptor in the Sertoli cells of a marsupial coincides with downregulation of anti-Müllerian hormone at the time of urogenital virilization. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 3, 317–325.
- Radder, R.S., Quinn, A.E., Georges, A., Sarre, S.D., and Shine, R. (2008). Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biol. Lett.* 4, 176–178.
- Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Graem, N., Müller, J., Cate, R.L., and Skakkebaek, N.E. (1999). Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3836–3844.
- Ramsey, M., and Crews, D. (2009). Steroid signaling and temperature-dependent sex determination-Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 283–292.
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.* 4, 690–700.
- Reed, K.J., and Sinclair, A.H. (2002). FET-1: a novel W-linked, female specific gene up-regulated in the embryonic chicken ovary. *Gene Expr. Patterns GEP* 2, 83–86.
- Rehberg, S., Lischka, P., Glaser, G., Stamminger, T., Wegner, M., and Rosorius, O. (2002). Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5826–5834.
- Renaud, E.J., MacLaughlin, D.T., Oliva, E., Rueda, B.R., and Donahoe, P.K. (2005). Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian Inhibiting Substance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 111–116.
- Rey, R. (1998). Endocrine, paracrine and cellular regulation of postnatal anti-müllerian hormone secretion by sertoli cells. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 9, 271–276.
- Rey, R., and Josso, N. (1996). Regulation of testicular anti-Müllerian hormone secretion. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 135, 144–152.
- Rey, R., Lordereau-Richard, I., Carel, J.C., Barbet, P., Cate, R.L., Roger, M., Chaussain, J.L., and Josso, N. (1993). Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1220–1226.
- Rey, R., Mebarki, F., Forest, M.G., Mowszowicz, I., Cate, R.L., Morel, Y., Chaussain, J.L., and Josso, N. (1994). Anti-müllerian hormone in children with androgen insensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 960–964.
- Rey, R., Al-Attar, L., Louis, F., Jaubert, F., Barbet, P., Nihoul-Fékété, C., Chaussain, J.L., and Josso, N. (1996a). Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am. J. Pathol.* 148, 1689–1698.

- Rey, R., Lhommé, C., Marcillac, I., Lahlou, N., Duvillard, P., Josso, N., and Bidart, J.M. (1996b). Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: comparative study with serum alpha-inhibin and estradiol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *174*, 958–965.
- Rey, R., Sabourin, J.C., Venara, M., Long, W.Q., Jaubert, F., Zeller, W.P., Duvillard, P., Chemes, H., and Bidart, J.M. (2000). Anti-Müllerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. *Hum. Pathol.* *31*, 1202–1208.
- Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C., and Bedecarrás, P. (2003). AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* *211*, 21–31.
- Rey, R.A., Musse, M., Venara, M., and Chemes, H.E. (2009). Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc. Res. Tech.* *72*, 787–795.
- Reynaud, G. (1981). Effect of busulfan on the germ cell line of the quail embryo. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Expérimentale* *70*, 251–258.
- Rhen, T., and Schroeder, A. (2010). Molecular mechanisms of sex determination in reptiles. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* *4*, 16–28.
- Richard-Mercier, N. (1977). Action of Busulfan on larval gonads of the Colorado Beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae). *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* *17*, 661–672.
- Richardson, B.E., and Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 37–49.
- Robert, N.M., Tremblay, J.J., and Viger, R.S. (2002). Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters. *Endocrinology* *143*, 3963–3973.
- Rocak, S., and Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 232–241.
- Rodgers, E.W., Earley, R.L., and Grober, M.S. (2007). Social status determines sexual phenotype in the bi-directional sex changing bluebanded goby *Lythrypnus dalli*. *J. Fish Biol.* *70*, 1660–1668.
- Rodríguez-Marí, A., Yan, Y.-L., BreMiller, R.A., Wilson, C., Cañestro, C., and Postlethwait, J.H. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Expr. Patterns* *5*, 655–667.
- Rogers, G.W., Jr, Komar, A.A., and Merrick, W.C. (2002). eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *72*, 307–331.
- Römer, U., and Beisenherz, W. (1996). Environmental determination of sex in *Apistogrammai* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *J. Fish Biol.* *48*, 714–725.
- Rota, A., Ballarin, C., Vigier, B., Cozzi, B., and Rey, R. (2002). Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* *129*, 39–44.
- Roussell, D.L., and Bennett, K.L. (1993). glh-1, a germ-line putative RNA helicase from *Caenorhabditis*, has four zinc fingers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 9300–9304.
- Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., and Milbrandt, J. (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 10939–10943.
- Saffman, E.E., and Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *55*, 1141–1163.

- Saitoh, N., Uchimura, Y., Tachibana, T., Sugahara, S., Saitoh, H., and Nakao, M. (2006). In situ SUMOylation analysis reveals a modulatory role of RanBP2 in the nuclear rim and PML bodies. *Exp. Cell Res.* 312, 1418–1430.
- Sakurai, N., Maruo, K., Haraguchi, S., Uno, Y., Oshima, Y., Tsutsui, K., Matsuda, Y., Do Rego, J.-L., Pelletier, G., Vaudry, H., *et al.* (2008). Immunohistochemical detection and biological activities of CYP17 (P450c17) in the indifferent gonad of the frog *Rana rugosa*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 112, 5–12.
- Sano, H., Nakamura, A., and Kobayashi, S. (2002). Identification of a transcriptional regulatory region for germline-specific expression of vasa gene in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* 112, 129–139.
- de Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., and Berta, P. (1998a). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6653–6665.
- de Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F., Boizet, B., and Berta, P. (1998b). Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-müllerian hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 29654–29660.
- de Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F., and Berta, P. (2000). Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 217, 293–298.
- Saotome, K., Hayashi, K., Adachi, N., Nakamura, Y., and Nakamura, M. (2010). Isolation and characterization of Vasa in the frog *Rana rugosa*. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Genet. Physiol.* 313, 452–459.
- Sarre, S.D., Ezaz, T., and Georges, A. (2011). Transitions between sex-determining systems in reptiles and amphibians. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12, 391–406.
- Schepers, G.E., Teasdale, R.D., and Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev. Cell* 3, 167–170.
- Schmid, M., and Steinlein, C. (2001). Sex chromosomes, sex-linked genes, and sex determination in the vertebrate class amphibia. *EXS* 143–176.
- Schmid, S.R., and Linder, P. (1992). D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol. Microbiol.* 6, 283–291.
- Schulz, R.W., Bogerd, J., Male, R., Ball, J., Fenske, M., Olsen, L.C., and Tyler, C.R. (2007). Estrogen-induced alterations in amh and dmrt1 expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6305–6310.
- Segev, D.L., Ha, T.U., Tran, T.T., Kenneally, M., Harkin, P., Jung, M., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Maheswaran, S. (2000). Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 28371–28379.
- Segev, D.L., Hoshiya, Y., Stephen, A.E., Hoshiya, M., Tran, T.T., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Maheswaran, S. (2001). Mullerian inhibiting substance regulates NFkappaB signaling and growth of mammary epithelial cells *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 276, 26799–26806.
- Segev, D.L., Hoshiya, Y., Hoshiya, M., Tran, T.T., Carey, J.L., Stephen, A.E., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Maheswaran, S. (2002). Mullerian-inhibiting substance regulates NF-kappa B signaling in the prostate *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 239–244.
- Seifer, D.B., MacLaughlin, D.T., Christian, B.P., Feng, B., and Shelden, R.M. (2002). Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil. Steril.* 77, 468–471.
- Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453, 930–934.

- Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2009). Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* **25**, 19–29.
- Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2013). Genetic control of testis development. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* **7**, 21–32.
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., and Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* **274**, 271–279.
- Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., and Yokoyama, S. (2006). Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. *Cell* **125**, 287–300.
- Shen, J.H.-C., and Ingraham, H.A. (2002). Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **16**, 529–540.
- Shen, W.H., Moore, C.C., Ikeda, Y., Parker, K.L., and Ingraham, H.A. (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* **77**, 651–661.
- Shestopalov, I.A., Pitt, C.L.W., and Chen, J.K. (2012). Spatiotemporal resolution of the *Ntla* transcriptome in axial mesoderm development. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 270–276.
- Shi, D.L., and Boucaut, J.C. (1995). The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 427–441.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700.
- Shi, H., Cordin, O., Minder, C.M., Linder, P., and Xu, R.-M. (2004). Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17628–17633.
- Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K., and Agata, K. (1999). Expression of vasa (vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev. Biol.* **206**, 73–87.
- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., and Hamaguchi, S. (2000). The vasa-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* **42**, 317–326.
- Shinomiya, A., Hamaguchi, S., and Shibata, N. (2001). Sexual differentiation of germ cell deficient gonads in the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* **290**, 402–410.
- Shiraishi, E., Yoshinaga, N., Miura, T., Yokoi, H., Wakamatsu, Y., Abe, S.-I., and Kitano, T. (2008). Müllerian Inhibiting Substance Is Required for Germ Cell Proliferation during Early Gonadal Differentiation in Medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* **149**, 1813–1819.
- Shirane, T. (1982). Gonadal differentiation in frogs, *Rana japonica* and *R. brevipoda*, raised from UV irradiated eggs. *J. Exp. Zool.* **223**, 165–173.
- Shoemaker, C.M., and Crews, D. (2009). Analyzing the Coordinated Gene Network Underlying Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 293–303.
- Shoemaker, C., Ramsey, M., Queen, J., and Crews, D. (2007). Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **236**, 1055–1063.
- Shoemaker-Daly, C.M., Jackson, K., Yatsu, R., Matsumoto, Y., and Crews, D. (2010). Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads. *Dev. Dyn.* **239**, 1061–1075.
- Siegfried, K.R. (2010). In search of determinants: gene expression during gonadal sex differentiation. *J. Fish Biol.* **76**, 1879–1902.

Siegfried, K.R., and Nüsslein-Volhard, C. (2008). Germ line control of female sex determination in zebrafish. *Dev. Biol.* 324, 277–287.

da Silva, S.M., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., and Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14, 62–68.

Sim, H., Argentaro, A., and Harley, V.R. (2008). Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 213–222.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–244.

Siomi, H., and Dreyfuss, G. (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 345–353.

Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Méndez, G., and Raz, E. (2005). Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4074–4079.

Smith, C.A., and Rayment, I. (1996). Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys. J.* 70, 1590–1602.

Smith, C.A., and Sinclair, A.H. (2004). Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 26, 120–132.

Smith, C.A., Smith, M.J., and Sinclair, A.H. (1999). Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234, 395–402.

Smith, C.A., Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., and Sinclair, A.H. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461, 267–271.

Smyk, M., Obersztyn, E., Nowakowska, B., Bocian, E., Cheung, S.W., Mazurczak, T., and Stankiewicz, P. (2007). Recurrent SOX9 deletion campomelic dysplasia due to somatic mosaicism in the father. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 866–870.

Sock, E., Pagon, R.A., Keymolen, K., Lissens, W., Wegner, M., and Scherer, G. (2003). Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1439–1447.

Sorokin, A.V., Kim, E.R., and Ovchinnikov, L.P. (2007). Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochem. Biokhimiia* 72, 1439–1457.

Soullier, S., Jay, P., Poulat, F., Vanacker, J.M., Berta, P., and Laudet, V. (1999). Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. *J. Mol. Evol.* 48, 517–527.

Spotila, L.D., Spotila, J.R., and Hall, S.E. (1998). Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J. Exp. Zool.* 281, 417–427.

Starz-Gaiano, M., and Lehmann, R. (2001). Moving towards the next generation. *Mech. Dev.* 105, 5–18.

Story, R.M., Li, H., and Abelson, J.N. (2001). Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1465–1470.

Strüssmann, C.A., and Nakamura, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 13–29.

Strüssmann, C.A., Saito, T., Usui, M., Yamada, H., and Takashima, F. (1997). Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *J. Exp. Zool.* 278, 167–177.

- Südbeck, P., and Scherer, G. (1997). Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J. Biol. Chem.* 272, 27848–27852.
- Südbeck, P., Schmitz, M.L., Baeuerle, P.A., and Scherer, G. (1996). Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat. Genet.* 13, 230–232.
- Summerton, J. (1999). Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 141–158.
- Summerton, J., and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 187–195.
- Tagami, T., and Nakamura, Y. (2011). Improving rates of germline transmission in chimeric chickens using busulfan solubilised sustained-release emulsion. *Avian Biol. Res.* 4, 74–77.
- Taguchi, O., Cunha, G.R., Lawrence, W.D., and Robboy, S.J. (1984). Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev. Biol.* 106, 394–398.
- Taieb, J., Grynberg, M., Pierre, A., Arouche, N., Massart, P., Belville, C., Hesters, L., Frydman, R., Catteau-Jonard, S., Fanchin, R., *et al.* (2011). FSH and its second messenger cAMP stimulate the transcription of human anti-Müllerian hormone in cultured granulosa cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 25, 645–655.
- Takada, S., and Koopman, P. (2003). Origin and possible roles of the Sox8 transcription factor gene during sexual development. *Cytogenet. Genome Res.* 101, 212–218.
- Takada, S., Wada, T., Kaneda, R., Choi, Y.L., Yamashita, Y., and Mano, H. (2006). Evidence for activation of *Amh* gene expression by steroidogenic factor 1. *Mech. Dev.* 123, 472–480.
- Takase, M., Noguchi, S., and Nakamura, M. (2000). Two Sox9 messenger RNA isoforms: isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa*. *FEBS Lett.* 466, 249–254.
- Taketo, T., Saeed, J., Manganaro, T., Takahashi, M., and Donahoe, P.K. (1993). Müllerian inhibiting substance production associated with loss of oocytes and testicular differentiation in the transplanted mouse XX gonadal primordium. *Biol. Reprod.* 49, 13–23.
- Tallafuss, A., Gibson, D., Morcos, P., Li, Y., Seredick, S., Eisen, J., and Washbourne, P. (2012). Turning gene function ON and OFF using sense and antisense photo-morpholinos in zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* 139, 1691–1699.
- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., and Noce, T. (2000). The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14, 841–853.
- Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., and Linder, P. (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell* 11, 127–138.
- Teixeira, J., He, W.W., Shah, P.C., Morikawa, N., Lee, M.M., Catlin, E.A., Hudson, P.L., Wing, J., Maclaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (1996). Developmental expression of a candidate müllerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinology* 137, 160–165.
- Teixeira, J., Kehas, D.J., Antun, R., and Donahoe, P.K. (1999). Transcriptional regulation of the rat Müllerian inhibiting substance type II receptor in rodent Leydig cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13831–13838.
- Teixeira, J., Maheswaran, S., and Donahoe, P.K. (2001). Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev.* 22, 657–674.
- Thevenet, L., Mejean, C., Moniot, B., Bonneaud, N., Galeotti, N., Aldrian-Herrada, G., Poulat, F., Berta, P., Benkirane, M., and Boizet-Bonhoure, B. (2004). Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J.* 23, 3336–3345.

Ten Dijke P., Piek, E. and Heldin, C. H (1999). Bone morphogenetic proteins and their receptors in Nature Encyclopedia of Life Sciences (London: Nature Publishing group.). London: Nature Publishing group.[http : // gate1. Inist. fr : 51010](http://gate1.inist.fr:51010).

Thibault, C., Levasseur, M.-C., and Hunter, R.H.F. (1993). "Reproduction in mammals and man" (Ellipses).

Thibault, C., Beaumont, A., Levasseur, M.C., (1998). "La reproduction des vertébrés" (Paris, MASSON). 307p. (Collection Enseignement des Sciences de la Vie).

Thomsen, M.K., Francis, J.C., and Swain, A. (2008). The role of Sox9 in prostate development. Differ. Res. Biol. Divers. 76, 728–735.

Thummel, R., Burket, C.T., and Hyde, D.R. (2006). Two different transgenes to study gene silencing and re-expression during zebrafish caudal fin and retinal regeneration. ScientificWorldJournal 6 Suppl 1, 65–81.

Thummel, R., Bailey, T.J., and Hyde, D.R. (2011). *In vivo* electroporation of morpholinos into the adult zebrafish retina. J. Vis. Exp. JoVE e3603.

Tiffoche, C., Chesnel, A., Jegou, P., and Le Pennec, J.P. (1993). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a *Pleurodeles* lectin. Eur. J. Biochem. FEBS 213, 901–907.

Tilmann, C., and Capel, B. (2002). Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. Recent Prog. Horm. Res. 57, 1–18.

Torres Maldonado, L.C., Landa Piedra, A., Moreno Mendoza, N., Marmolejo Valencia, A., Meza Martínez, A., and Merchant Larios, H. (2002). Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. Gen. Comp. Endocrinol. 129, 20–26.

Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., and Noce, T. (2000). Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. Mech. Dev. 93, 139–149.

Tran, D., and Josso, N. (1982). Localization of Anti-Müllerian Hormone in the Rough Endoplasmic Reticulum of the Developing Bovine Sertoli Cell Using Immunocytochemistry with a Monoclonal Antibody. Endocrinology 111, 1562–1567.

Tran, D., Josso, N., and Meusy-Dessolle, N. (1977). Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. Nature 269, 411–412.

Trefil, P., Polak, J., Poplstein, M., Mikus, T., Kotrbová, A., and Rozinek, J. (2003). Preparation of fowl testes as recipient organs to germ-line chimeras by means of gamma-radiation. Br. Poult. Sci. 44, 643–650.

Trefil, P., Micáková, A., Mucksová, J., Hejnar, J., Poplstein, M., Bakst, M.R., Kalina, J., and Brillard, J.-P. (2006). Restoration of spermatogenesis and male fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken. Biol. Reprod. 75, 575–581.

Tremblay, J.J., and Viger, R.S. (1999). Transcription factor GATA-4 enhances Müllerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. Mol. Endocrinol. Baltim. Md 13, 1388–1401.

Tremblay, J.J., and Viger, R.S. (2001). Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. Biol. Reprod. 64, 1191–1199.

Tsuda, M., Takahashi, S., Takahashi, Y., and Asahara, H. (2003). Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression *via* association with Sox9. J. Biol. Chem. 278, 27224–27229.

Tsuji, M., Shima, H., Yonemura, C.Y., Brody, J., Donahoe, P.K., and Cunha, G.R. (1992). Effect of human recombinant mullerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during mullerian duct regression in the rat. Endocrinology 131, 1481–1488.

- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., and Noce, T. (2000). Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2741–2750.
- Ueno, S., Kuroda, T., Maclaughlin, D.T., Ragin, R.C., Manganaro, T.F., and Donahoe, P.K. (1989). Mullerian inhibiting substance in the adult rat ovary during various stages of the estrous cycle. *Endocrinology* 125, 1060–1066.
- Uller, T., and Helanterä, H. (2011). From the origin of sex-determining factors to the evolution of sex-determining systems. *Q. Rev. Biol.* 86, 163–180.
- Umans, L., Vermeire, L., Francis, A., Chang, H., Huylebroeck, D., and Zwijsen, A. (2003). Generation of a floxed allele of Smad5 for cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genes. New York N* 2000 37, 5–11.
- Urushitani, H., Katsu, Y., Miyagawa, S., Kohno, S., Ohta, Y., Guillette, L.J., Jr, and Iguchi, T. (2011). Molecular cloning of anti-Müllerian hormone from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 333, 190–199.
- Vaillant, S., Magre, S., Dorizzi, M., Pieau, C., and Richard-Mercier, N. (2001a). Expression of AMH, SF1, and SOX9 in gonads of genetic female chickens during sex reversal induced by an aromatase inhibitor. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 222, 228–237.
- Vaillant, S., Dorizzi, M., Pieau, C., and Richard-Mercier, N. (2001b). Sex reversal and aromatase in chicken. *J. Exp. Zool.* 290, 727–740.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., and McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397, 405–409.
- Valleley, E.M., Cartwright, E.J., Croft, N.J., Markham, A.F., and Coletta, P.L. (2001). Characterisation and expression of Sox9 in the Leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J. Exp. Zool.* 291, 85–91.
- de Vet, A., Laven, J.S.E., de Jong, F.H., Themmen, A.P.N., and Fauser, B.C.J.M. (2002). Anti-müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil. Steril.* 77, 357–362.
- Vidal, V.P.I., Chaboissier, M.-C., de Rooij, D.G., and Schedl, A. (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28, 216–217.
- Viger, R.S., Mertineit, C., Trasler, J.M., and Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Dev. Camb. Engl.* 125, 2665–2675.
- Vigier, B., Tran, D., du Mesnil du Buisson, F., Heyman, Y., and Josso, N. (1983). Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-Müllerian hormone. *J. Reprod. Fertil.* 69, 207–214.
- Vigier, B., Picard, J.Y., Tran, D., Legeai, L., and Josso, N. (1984). Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 114, 1315–1320.
- Vigier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran, D., and Josso, N. (1987). Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it *in vitro*. *Dev. Camb. Engl.* 100, 43–55.
- Vigier, B., Forest, M.G., Eychenne, B., Bézard, J., Garrigou, O., Robel, P., and Josso, N. (1989). Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3684–3688.
- Visser, J.A., McLuskey, A., van Beers, T., Weghuis, D.O., van Kessel, A.G., Grootegoed, J.A., and Themmen, A.P. (1995). Structure and chromosomal localization of the human anti-müllerian hormone type II receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 1029–1036.
- Visser, J.A., Olaso, R., Verhoef-Post, M., Kramer, P., Themmen, A.P., and Ingraham, H.A. (2001). The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signaling. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 936–945.

- Visser, J.A., Durlinger, A.L.L., Peters, I.J.J., van den Heuvel, E.R., Rose, U.M., Kramer, P., de Jong, F.H., and Themmen, A.P.N. (2007). Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology* 148, 2301–2308.
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., and Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 2198–2206.
- Volff, J.-N., Kondo, M., and Schartl, M. (2003). Medaka *dmY/dmrt1Y* is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends Genet. TIG* 19, 196–199.
- Voutilainen, R., and Miller, W.L. (1987). Human müllerian inhibitory factor messenger ribonucleic acid is hormonally regulated in the fetal testis and in adult granulosa cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 1, 604–608.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F.D., Keutel, J., Hustert, E., *et al.* (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79, 1111–1120.
- Wagstaff, K.M., and Jans, D.A. (2009). Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic Cph. Den.* 10, 1188–1198.
- Wainwright, E.N., and Wilhelm, D. (2010). Chapter Six - The Game Plan: Cellular and Molecular Mechanisms of Mammalian Testis Development. In *Current Topics in Developmental Biology*, Peter Koopman, ed. (Academic Press), pp. 231–262.
- Wakahara, M. (1996). Primordial germ cell development: is the urodele pattern closer to mammals than to anurans? *Int. J. Dev. Biol.* 40, 653–659.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945–951.
- Wallace, H., and Wallace, B.M. (2000). Sex reversal of the newt *Triturus cristatus* reared at extreme temperatures. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 807–810.
- Wallacides, A., Chesnel, A., Chardard, D., Flament, S., and Dumond, H. (2009). Evidence for a conserved role of retinoic acid in urodele amphibian meiosis onset. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 1389–1398.
- Wang, X.G., and Orban, L. (2007). Anti-Müllerian hormone and 11 beta-hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 1329–1338.
- Wang, P.-Y., Koishi, K., McGeachie, A.B., Kimber, M., Maclaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and McLennan, I.S. (2005). Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16421–16425.
- Warr, N., and Greenfield, A. (2012). The molecular and cellular basis of gonadal sex reversal in mice and humans. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 559–577.
- Watanabe, K., Clarke, T.R., Lane, A.H., Wang, X., and Donahoe, P.K. (2000). Endogenous expression of Müllerian inhibiting substance in early postnatal rat sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1624–1629.
- Waters, P.D., Wallis, M.C., and Marshall Graves, J.A. (2007). Mammalian sex--Origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 389–400.
- Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 27, 1409–1420.
- Wegner, M. (2010). All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 381–390.

- Weidinger, G., Wolke, U., Köprunner, M., Klinger, M., and Raz, E. (1999). Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* 126, 5295–5307.
- Weidinger, G., Wolke, U., Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2002). Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. *Dev. Camb. Engl.* 129, 25–36.
- Welshons, W.J., and Russell, L.B. (1959). THE Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 560–566.
- Western, P.S., Harry, J.L., Graves, J.A., and Sinclair, A.H. (1999a). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 216, 411–419.
- Western, P.S., Harry, J.L., Graves, J.A., and Sinclair, A.H. (1999b). Temperature-dependent sex determination: upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 214, 171–177.
- Western, P.S., Harry, J.L., Marshall Graves, J.A., and Sinclair, A.H. (2000). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* 241, 223–232.
- Wibbels, T., Cowan, J., and LeBoeuf, R. (1998). Temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J. Exp. Zool.* 281, 409–416.
- Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M.J., Combes, A.N., Beverdam, A., Bowles, J., Mizusaki, H., and Koopman, P. (2005). Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* 287, 111–124.
- Wilhelm, D., Hiramatsu, R., Mizusaki, H., Widjaja, L., Combes, A.N., Kanai, Y., and Koopman, P. (2007). SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription *in vivo* to ensure testis development. *J. Biol. Chem.* 282, 10553–10560.
- Wilson, M., and Koopman, P. (2002). Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 441–446.
- Wilson, C.A., di Clemente, N., Ehrenfels, C., Pepinsky, R.B., Josso, N., Vigier, B., and Cate, R.L. (1993). Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 7, 247–257.
- Wolke, U., Weidinger, G., Köprunner, M., and Raz, E. (2002). Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the zebrafish. *Curr. Biol. CB* 12, 289–294.
- Wright, E., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A., and Koopman, P. (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* 9, 15–20.
- Wylie, C. (2000). Germ cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 410–413.
- Wylie, C. (1999). Germ Cells. *Cell* 96, 165–174.
- Wylie, C.C., Bancroft, M., and Heasman, J. (1976). The formation of the gonadal ridge in *Xenopus laevis*. II. A scanning electron microscope study. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 35, 139–148.
- Yamashita, H., Ten Dijke, P., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1996). Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 19, 569–574.
- Yamazoe, S., Shestopalov, I.A., Provost, E., Leach, S.D., and Chen, J.K. (2012). Cyclic caged morpholinos: conformationally gated probes of embryonic gene function. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51, 6908–6911.

Yang, X., Li, C., Herrera, P.-L., and Deng, C.-X. (2002). Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genes*. New York N 2000 32, 80–81.

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

Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., and Guiguen, Y. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evol. Appl.* 6, 486–496.

Yi, S.E., Daluiski, A., Pederson, R., Rosen, V., and Lyons, K.M. (2000). The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Dev. Camb. Engl.* 127, 621–630.

Yokoi, H., Kobayashi, T., Tanaka, M., Nagahama, Y., Wakamatsu, Y., Takeda, H., Araki, K., Morohashi, K.-I., and Ozato, K. (2002). Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 5–16.

Yoon, C., Kawakami, K., and Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3157–3165.

Yoshimoto, S., and Ito, M. (2011). A ZZ/ZW-type sex determination in *Xenopus laevis*. *FEBS J.* 278, 1020–1026.

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., and Ito, M. (2008). A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2469–2474.

Yoshimoto, S., Ikeda, N., Izutsu, Y., Shiba, T., Takamatsu, N., and Ito, M. (2010). Opposite roles of DMRT1 and its W-linked paralogue, DM-W, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. *Dev. Camb. Engl.* 137, 2519–2526.

Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Yamamoto, T., Iguchi, T., Abe, S., and Kitano, T. (2004). Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 508–513.

Young, J., Rey, R., Schaison, G., and Chanson, P. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism as a model of post-natal testicular anti-Müllerian hormone secretion in humans. *Mol. Cell. Endocrinol.* 211, 51–54.

Zaborski, P. (1986). Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and H-Y antigen expression in gonads of a newt. *Prog. Clin. Biol. Res.* 217A, 163–169.

Zhan, Y., Fujino, A., MacLaughlin, D.T., Manganaro, T.F., Szotek, P.P., Arango, N.A., Teixeira, J., and Donahoe, P.K. (2006). Müllerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Müllerian duct regression. *Dev. Camb. Engl.* 133, 2359–2369.

Zhao, L., and Koopman, P. (2012). SRY protein function in sex determination: thinking outside the box. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 20, 153–162.

van der Zwan, Y.G., Brüggewirth, H.T., Drop, S.L.S., Wolffenbuttel, K.P., Madern, G.C., Looijenga, L.H.J., and Visser, J.A. (2012). A novel AMH missense mutation in a patient with persistent Müllerian duct syndrome. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 6, 279–283.

Zwijnen, A., Verschueren, K., and Huylebroeck, D. (2003). New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett.* 546, 133–139.

Résumé

Dans le contexte de la physiologie comparée de la reproduction, les amphibiens sont peu étudiés. Le travail réalisé durant cette thèse visait à analyser des marqueurs de différenciation testiculaire chez l'urodèle *Pleurodeles waltl*, dont le déterminisme génétique du sexe (ZZ/ZW) peut être influencé par la température.

Nos études ont d'abord porté sur le gène *sox9* marqueur de la différenciation testiculaire chez les vertébrés supérieurs. Le gène cloné chez le pleurodèle montre une bonne conservation par rapport aux autres vertébrés. Son expression plus élevée dans la gonade mâle n'apparaît que tardivement suggérant qu'il n'est probablement pas impliqué dans les stades précoces de la différenciation testiculaire. En outre, son expression dans le mésonephros rend difficile son utilisation comme marqueur de différenciation testiculaire.

Nous avons ensuite étudié l'Amh, hormone testiculaire impliquée dans la régression des canaux de Müller chez de nombreux vertébrés. Son expression spécifique de la gonade, précocement plus élevée chez les larves ZZ que les ZW en font un excellent marqueur de la différenciation testiculaire. Le fait que les pleurodèles mâles voient les canaux de Müller persister malgré la présence d'Amh suggère que la fonction primaire de cette hormone était en relation avec la différenciation gonadique et que la fonction de régression des canaux de Müller n'est apparue que secondairement au cours de l'évolution.

Ces marqueurs ont été mis à profit pour caractériser le phénotype gonadique lors d'inversions sexuelles ou lors de développements en absence de cellules germinales. Ils ont permis de montrer que les cellules germinales ne semblent pas jouer de rôle dans la différenciation gonadique du pleurodèle.

Mots clés : amphibien, *Pleurodeles waltl*, différenciation gonadique, cellules germinales, *sox9*, Amh, aromatase, busulfan.

Summary

In the context of comparative physiology of reproduction, amphibians are poorly studied. This work was dedicated to the analysis of testis differentiation markers in the newt *Pleurodeles waltl*, which shows a ZZ/ZW genetic mode of sex determination that can be affected by temperature.

First, we studied *sox9*, a testis differentiation marker well characterized in many higher vertebrates. The gene cloned in *Pleurodeles* shows a good level of identity with other vertebrates. The testis-enriched expression appears late during the testis differentiation process indicating that it is probably not involved in the early steps of testis differentiation. Its use as a marker of testicular differentiation proved difficult since it is expressed not only in the gonads but also in the mesonephros.

Then, we studied *amh*, a testis hormone responsible for müllerian duct regression in many vertebrates. Its early expression in the gonad, significantly higher in male than in female larvae makes it an excellent marker for testis differentiation. Since in *Pleurodeles waltl*, Müllerian ducts persist in males, it suggests that during the course of evolution, the function of Amh on the regression of Müllerian ducts appeared secondarily after its role in gonadal differentiation.

These markers have been used to characterize the gonadal phenotype during sex reversal, or in gonads developed in the absence of germ cells. They showed that these cells do not seem to play a role in gonadal differentiation of *Pleurodeles waltl*.

Keywords: amphibian, *Pleurodeles waltl*, gonadal differentiation, germ cells, *sox9*, Amh, aromatase, busulfan.