



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>



FACULTÉ DES SCIENCES
U.F.R. Sciences & Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie Santé



Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Biologie Cellulaire

par **Dominique CHARDARD**

**Séquences homologues au gène SRY et activité de l'aromatase
lors de la différenciation du sexe des gonades et de leurs inversions
sexuelles par la température ou par les hormones stéroïdes chez *Pleurodeles
waltl* (Amphibien Urodèle)**

Soutenue publiquement le 04 Octobre 1996 devant la commission d'examen :

| | | |
|----------------------|-------------------|---|
| Présidente du jury : | Mme S. MAGRE | Sous-Directrice au Collège de France, Paris |
| Rapporteurs : | M. C. PIEAU | Directeur de recherche CNRS, Paris |
| | M. B. VIGIER | Directeur de recherche CNRS, Paris |
| Examineurs : | M. J.F. BAROILLER | Chargé de recherche CIRAD-INRA, Rennes |
| | M. C. DOURNON | Professeur, Université H. Poincaré, Nancy I |

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur C. Dournon, directeur du laboratoire de Biologie Expérimentale - Immunologie, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour mon D.E.A., puis pour ces quatre années de thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur C. Pieau, à qui l'étude de la détermination du sexe par la température doit tant, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je lui exprime ma reconnaissance pour sa compétence et sa gentillesse ainsi que pour le nouvel essor qu'il a su donner à mon travail de recherche à un moment difficile de ma thèse.

Monsieur B. Vigier, pionnier des recherches sur l'hormone anti-müllérienne, me fait l'honneur de venir à Nancy juger ce travail. Je lui en suis très reconnaissant.

Je remercie de même très vivement Madame S. Magre, spécialiste de la différenciation testiculaire, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur J.F. Baroiller a accepté de juger ce travail et d'y apporter le point de vue d'un spécialiste de la différenciation sexuelle chez les poissons. Qu'il trouve ici mes plus sincères remerciements.

Merci à tous les collègues de fortune et d'infortune, du laboratoire et des autres laboratoires pour les discussions, les conseils, et les "petits" dépannages.

Merci enfin aux deux personnes sans qui cette thèse n'aurait pu être réalisée, mes parents.

Nous avons étudié les bases génétiques de la détermination du sexe chez le pleurodèle en recherchant des gènes homologues de SRY, déterminant testiculaire des mammifères. Une séquence Sox (SRY-box containing gene) a été clonée chez le pleurodèle mais elle ne joue sans doute aucun rôle dans la détermination sexuelle. Nous avons également étudié l'activité de l'aromatase au cours de la différenciation gonadique. La régulation de l'expression de cette enzyme constitue un événement-clé de la différenciation sexuelle chez les vertébrés hétérothermes. L'activité aromatase a été étudiée dans les conditions de différenciation sexuelle normale et sous l'effet de traitements thermiques et hormonaux qui inversent le sexe phénotypique. Des traitements de larves par divers inhibiteurs, comme des inhibiteurs de l'aromatase, ou d'hormones, comme l'oestradiol et la dihydrotestostérone, ont également été entrepris. Les résultats obtenus montrent le rôle primordial de l'oestradiol et de l'aromatase dans la différenciation sexuelle du pleurodèle. La dihydrotestostérone pourrait également intervenir de façon importante dans la différenciation mâle.

mots-clés : Détermination du sexe - Amphibien - Pleurodèle - Gène SRY - Aromatase - Stéroïdes -
Température.

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION.

| | |
|---|----|
| 1-La différenciation sexuelle chez les vertébrés. | 3 |
| 2- Détermination génétique du sexe : cas des Mammifères. | 5 |
| 2-1- Rôle des stéroïdes chez les Mammifères. | 5 |
| 2-2- TDF. | 6 |
| 2-3- SRY. | 6 |
| 2-3-1- Isolement. | 6 |
| 2-3-2- Expression. | 7 |
| 2-3-3- SRY et inversion sexuelle. | 8 |
| 2-3-4- Rôle. | 9 |
| 2-3-5- Conservation de SRY chez les Mammifères. | 9 |
| 2-4- Les gènes Sox. | 10 |
| 2-4-1- Isolement. | 10 |
| 2-4-2- Rôle des gènes Sox. | 11 |
| 2-4-3- Mode d'action. | 14 |
| 2-4-4- SOX9. | 14 |
| 2-5- L'AMH. | 15 |
| 2-6- SF1. | 17 |
| 2-7- Duplication du Xp et inversion sexuelle. | 19 |
| 3- L'influence de la température sur la détermination sexuelle. | 20 |
| 3-1- Chez les Amphibiens. | 20 |
| 3-2- Chez les Reptiles. | 23 |
| 3-3- Chez les Poissons. | 25 |
| 4- L'effet des stéroïdes sur la différenciation sexuelle. | 26 |
| 4-1- La biosynthèse des stéroïdes sexuels. | 26 |
| 4-2- Effet des stéroïdes exogènes. | 27 |
| 4-2-1- Effet des oestrogènes exogènes. | 27 |
| 4-2-2- Effet des androgènes exogènes. | 29 |
| 4-2-3- Effet paradoxal des stéroïdes exogènes. | 29 |
| 4-3- Métabolisme des stéroïdes sexuels dans les gonades au cours de la différenciation. | 30 |
| 4-3-1- Contenu des gonades en stéroïdes. | 30 |
| 4-3-2- Activité de la 3 β HSD. | 30 |
| 4-3-3- Action du tamoxifène. | 30 |
| 4-3-4- Activité de l'aromatase. | 31 |
| 4-3-5- Action des inhibiteurs d'aromatase. | 31 |
| 4-4- Rôle des stéroïdes dans la détermination sexuelle. | 32 |

II- MATERIEL ET METHODES.

| | |
|---|----|
| 1- Elevage des animaux. | 36 |
| 2- Détermination du génotype sexuel. | 36 |
| 3- Traitement par la température d'élevage. | 37 |
| 4- Traitements hormonaux et chimiques. | 37 |
| 5- Histologie. | 37 |
| 6- Dosage de l'activité aromatasase. | 40 |
| 7- Analyse statistique. | 40 |
| 8- Isolement de la séquence PwSox1. | 41 |
| 9- Southern blot. | 41 |
| 10- Hybridation <i>in situ</i> sur chromosomes en écouvillon. | 42 |

III- RESULTATS.

PREMIERE PARTIE : RECHERCHE DE SEQUENCES SOX CHEZ LE PLEURODELE.

| | |
|---|----|
| 1- Isolement d'une séquence Sox chez le pleurodèle. | 43 |
| 2- Conservation de PwSox1. | 44 |
| 3- Hybridation sur chromosomes en écouvillon. | 46 |
| Conclusion. | 46 |

DEUXIEME PARTIE : ACTIVITE DE L'AROMATASE ET ACTION DES HORMONES SEXUELLES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION SEXUELLE.

| | |
|---|----|
| 1- Activité aromatasase au cours de la différenciation sexuelle. | 47 |
| 2- Influence de la température sur la différenciation sexuelle et l'activité aromatasase. | 48 |
| 3- Influence de l'oestradiol sur la différenciation sexuelle. | 50 |
| 3-1- Effets d'un traitement à l'oestradiol sur la différenciation sexuelle. | 50 |
| 3-2- Effets de l'oestradiol sur l'activité aromatasase. | 52 |
| 3-3- Effets du tamoxifène sur la différenciation sexuelle. | 53 |
| 4- Influence d'inhibiteurs de l'aromatasase sur la différenciation sexuelle. | 54 |
| 4-1- Effets des inhibiteurs sur l'activité aromatasase. | 54 |
| 4-2- Effets des inhibiteurs de l'aromatasase sur la différenciation sexuelle. | 55 |
| 4-2-1- Effets du miconazole. | 55 |
| 4-2-2- Effets du fadrozole. | 56 |
| 5- Influence de la dihydrotestostérone sur la différenciation sexuelle. | 59 |
| Conclusion. | 63 |

IV- DISCUSSION.

BIBLIOGRAPHIE.

ANNEXES.

INTRODUCTION

La détermination et la différenciation d'organes sexuels permettant aux organismes de se reproduire constituent pour les espèces un enjeu d'une importance capitale. Dans le monde animal, en plus de la diversité des modes de reproduction, les mécanismes de déterminisme du sexe sont très variés, contrairement aux mécanismes de nombreuses étapes-clés du développement qui sont souvent bien conservées. Cette variété provient du rôle de la détermination sexuelle dans la spéciation. La plupart des espèces présentent un système génétique de détermination, le sexe de l'individu étant déterminé dès la fécondation, alors que d'autres espèces ont leur sexe déterminé par certains facteurs de l'environnement.

Là encore, à l'intérieur de chacun de ces deux systèmes, la diversité est de mise. Hétérogamétie mâle, hétérogamétie femelle,

Xo sont, parmi d'autres, les principaux modes de déterminisme génétique du sexe. Chez des Invertébrés, comme la drosophile et le nématode *Caenorhabditis elegans*, la détermination du sexe se fait par les mêmes mécanismes que la compensation de dosage (compensation de la présence de deux chromosomes sexuels identiques chez les individus du sexe homogamétique par rapport à l'autre sexe). Chez les Vertébrés, comme les Mammifères, ces deux phénomènes sont découplés, bien que certains gènes de la détermination sexuelle soient dosage-dépendants.

Les facteurs de l'environnement intervenant dans la détermination sexuelle, comme chez les Vertébrés poïkilothermes par exemple, sont relativement nombreux : caractéristiques chimiques de l'eau, facteurs sociaux et comportementaux, température.

1- LA DIFFERENCIATION SEXUELLE CHEZ LES VERTEBRES.

L'embryon de Vertébré est sexuellement bipotentiel : il ne possède pas, jusqu'à un certain stade de développement, de structures sexuelles décelables bien que, dans la plupart des cas, le sexe soit génétiquement établi dès la

fécondation. Les gonades apparaissent sous une forme indifférenciée, les crêtes génitales. Celles-ci proviennent d'un épaissement de la paroi du mésoderme somatopleural et d'une condensation cellulaire d'origine mésoné-

phrétique. Cette différenciation est semblable dans les deux sexes et correspond au stade dit sexuellement indifférencié.

Auparavant, le pronephros a mis en place une paire de canaux de Wolff auxquels se connectent les mésonephros et qui seront longés par les futurs oviductes, les canaux de Müller. Le premier signe de différenciation du sexe gonadique mâle est l'apparition dans la partie médullaire de la gonade, de cordons séminifères, ébauches des futurs tubes séminifères du testicule. Cette période correspond également à une différenciation des cellules de Sertoli. Les hormones testiculaires provoqueront ensuite la régression des canaux de Müller et seront responsables du développement des canaux de Wolff et de la masculinisation du tractus urogénital.

La gonade femelle reste à un stade indifférencié plus longtemps que les gonades en développement testiculaire. Son édification se réalise, contrairement au testicule, à partir du cortex de la gonade. Chez l'embryon femelle, les canaux de Wolff seront urinaires chez les Anamniotes adultes et régresseront chez les Amniotes adultes. Les canaux de Müller persistent et se développent en oviductes.

Ainsi, la différenciation des gonades se réalise à partir de deux composants distincts des gonades : la médulla pour le testicule et le cortex pour l'ovaire.

Ce schéma de développement présente plusieurs niveaux de régulation. Des dysfonctionnements de l'un ou l'autre de ces niveaux entraîneront des degrés différents d'inversion sexuelle.

Un premier niveau de régulation correspond à la différenciation des gonades primordiales : une mauvaise régulation de ce

niveau provoque l'absence de gonades (agénésie gonadique).

Le deuxième niveau de régulation correspond à la différenciation sexuelle des gonades, qui détermine les caractères sexuels primaires (et par suite les autres caractères sexuels) : c'est à ce niveau que l'on pourra observer les inversions sexuelles complètes (dysgénésie gonadique complète).

Les niveaux suivants correspondent à la mise en place du tractus urogénital (caractères sexuels secondaires) et des caractères sexuels tertiaires : une altération de ces niveaux conduira à des masculinisations ou féminisations partielles de l'organisme (pseudohermaphrodisme).

Chez les Vertébrés, le contrôle de la détermination sexuelle est, dans la majorité des cas, d'origine génétique.

Chez les Mammifères, de nombreux gènes de ce processus sont maintenant connus, mais l'orchestration de ces différents éléments reste obscure. Une fois la différenciation sexuelle des gonades enclenchée, des processus hormonaux prennent le relais pour la suite de la différenciation sexuelle.

Chez les Vertébrés non-mammaliens, les hormones semblent intervenir pour une part importante dans la détermination sexuelle. Par ailleurs, chez les Vertébrés poïkilothermes, la détermination du sexe de l'individu par la température est un phénomène relativement répandu, notamment chez les Reptiles.

L'étude des relations entre la détermination génétique du sexe et la détermination par la température en est encore à ses débuts. Néanmoins, des relations entre l'action des hormones sexuelles et celle de la température ont pu être établies.

2- DETERMINATION GENETIQUE DU SEXE : CAS DES MAMMIFERES.

2.1- Rôle des stéroïdes chez les Mammifères.

Chez les Mammifères, des hormones produites par le testicule, comme les androgènes et l'hormone anti-Müllerienne (AMH), sont responsables du développement du phénotype mâle. L'AMH sécrétée par les cellules de Sertoli provoque la régression des canaux de Müller tandis que la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig provoque le développement des canaux de Wolff qui donneront les épидидymes, les canaux déférents et les vésicules séminales. La dihydrotestostérone est plus particulièrement responsable du développement des organes génitaux externes : scrotum et pénis. Après l'initiation de la différenciation testiculaire, ces hormones permettront le développement des caractères morphologiques, physiologiques et comportementaux du sexe mâle.

Une castration d'un embryon mâle entraîne un phénotype femelle et un traitement par des androgènes d'un embryon femelle une masculinisation des caractères sexuels secondaires.

Les stéroïdes sont impliqués dans la différenciation sexuelle mais, selon l'opinion communément admise, ne joueraient pas de rôle dans la détermination sexuelle. En effet, chez les Mammifères, l'inversion sexuelle complète par des stéroïdes est difficile, voire impossible à obtenir ; la sécrétion des stéroïdes

serait plutôt une conséquence qu'une cause de la détermination sexuelle.

Cependant, des oestrogènes exogènes inversent le sexe des embryons mâles chez les Métathériens comme l'opposum et le wallaby (Burns, 1955 ; 1961 ; Shaw *et al.*, 1988), alors que les stéroïdes n'ont pas d'effet chez les Euthériens. Chez ces derniers, il pourrait rester néanmoins une sensibilité ancestrale : des gonades primordiales d'embryons de souris transplantées sous la capsule rénale de mâles adultes se développent en ovotestis (Taketo *et al.*, 1988).

En revanche, chez le lapin, une mutation du gène codant pour le cytochrome P450 scc n'inhibe pas la formation des surrénales et des gonades (Pang *et al.*, 1992). De même, l'inactivation du gène du récepteur de l'oestradiol chez la souris n'entraîne pas d'inversion sexuelle : les seuls effets observés sont un utérus hypoplasique, l'absence de corps jaunes et une stérilité (Lubahn *et al.*, 1993).

Chez les Mammifères, les ovaires ne sont pas indispensables à la féminisation du tractus génital et de l'organisme, ce qui a conduit à la définition du sexe femelle comme le "sexe de base". Des fragments de tractus génital des deux sexes cultivés *in vitro* dans un milieu dépourvu d'hormones montrent une

persistance des canaux de Müller et une régression des canaux de Wolff. Dans les années quarante, Jost a montré que le prélèvement des crêtes génitales sur des embryons de lapin, avant le début de la différenciation sexuelle, entraîne le développement de tous ces embryons en femelles. Parallèlement, une greffe de testicule sur un embryon femelle provoque une différenciation mâle du tractus génital. Enfin,

l'implantation d'un cristal d'androgène dans la cavité abdominale d'un mâle castré stimule le développement des canaux mâles mais n'inhibe pas le développement des canaux de Müller (Jost, 1947, 1953). Il en a été déduit que c'était la présence ou l'absence de testicules qui déterminait la différenciation sexuelle du tractus génital, en particulier la présence d'androgènes et de l'hormone anti-Müllerienne.

2.2- TDF.

En 1959 fut démontré le rôle du chromosome Y dans la détermination sexuelle (Ford *et al.*, 1959 ; Jacobs et Strong, 1959) : les individus avec un seul chromosome X se différencient en femelles et ceux avec un ou plusieurs X et un chromosome Y se différencient en mâles. Il fut alors postulé l'existence d'un ou plusieurs gènes dominants situés sur le chromosome Y et intervenant dans la détermination testiculaire. Ce gène fut nommé TDF, Testis Determining Factor. Les caractéristiques que l'on attendait de ce gène étaient :

- une conservation dans l'évolution.

- une expression précoce au cours du développement embryonnaire au moment de la différenciation des gonades en testicules.

- une expression spécifique des mâles.

- une expression limitée aux gonades.

- une expression et des mutations expliquant des pathologies de la détermination du sexe principalement observées chez l'homme.

Ce sont ces pathologies de la détermination du sexe qui ont permis une étude de plus en plus précise de la région du chromosome Y qui porte TDF.

2.3- SRY.

2.3.1-Isolement.

L'étude des cas d'hommes XX (fréquence : 1/20 000 naissances mâles) qui ont hérité, le plus souvent sur le chromosome X, d'un fragment du bras court du

chromosome Y, a permis de localiser TDF peu avant la région pseudo-autosomique (région homologue avec le chromosome X qui permet l'appariement lors de la méiose).

Page *et al.* (1987) ont pu localiser la région portant TDF à 140-280 Kb de la région pseudo-autosomique. Un seul gène a été découvert dans cette région : ZFY, codant pour un facteur de transcription à "doigt de zinc" (Zinc Finger Y). Chez la souris, les homologues de ZFY, Zfy1 et Zfy2, sont situés dans la région du chromosome Y connue pour contenir Tdy, l'homologue murin de TDF (Mardon *et al.*, 1989).

Mais Sinclair *et al.* (1988) ont montré peu de temps après que chez les Marsupiaux, les gènes homologues de ZFY étaient autosomaux. De plus, Koopman *et al.* (1989) ont mis en évidence que l'expression de Zfy n'est pas détectée chez des souris mâles porteuses d'une mutation empêchant le développement des cellules germinales, diminuant encore les chances de ZFY d'être TDF. Enfin, Palmer *et al.* (1989) ont décrit les cas de quatre hommes XX ayant hérité d'un morceau du chromosome Y ne contenant pas ZFY, réduisant ainsi la portion du chromosome Y portant TDF à 35-40 Kb de la région pseudo-autosomique.

Dans cette portion spécifique du chromosome Y, Sinclair *et al.* (1990) ont découvert une seule séquence conservée chez les Mammifères Euthériens et correspondant au gène SRY (Sex determining Region of the Y chromosome). Chez la souris, le gène homologue, Sry (par convention, le gène humain est écrit en majuscules et le gène murin en minuscules), est situé dans la région Sxr qui correspond à la région déterminant le développement testiculaire (Gubbay *et al.*, 1990).

Le gène SRY des Mammifères code pour une protéine qui se lie à l'ADN grâce à un motif "HMG-box". Les protéines HMG sont des protéines nucléaires caractérisées par une forte mobilité électrophorétique (High Mobility Group). Ces protéines se fixent à l'ADN sans spécificité de séquence grâce à un domaine de 80 acides aminés : le domaine HMG. Ce domaine a depuis été découvert dans différents facteurs de transcription dont l'un des mieux caractérisés est la protéine SRY.

2.3.2- Expression.

L'expression spatiotemporelle de SRY semble en accord avec un rôle important dans la détermination sexuelle. Les premières analyses en northern blot ont montré que SRY est exprimé dans le testicule adulte chez l'homme et chez la souris (Sinclair *et al.*, 1990 Gubbay *et al.*, 1990). Au cours du développement, chez la souris, Sry est exprimé à partir de 10,5 jours *post coitum* (j. p. c.) dans les crêtes génitales des embryons mâles jusqu'à 12,5 jours, ce qui correspond au premier stade de différenciation du testicule (Koopman *et al.*, 1990).

L'expression embryonnaire de Sry, contrairement à l'expression dans le testicule adulte, ne dépend pas de la présence des cellules germinales puisque des embryons homozygotes pour la mutation W (mutation qui empêche le développement des cellules germinales) expriment normalement Sry et développent des testicules (Koopman *et al.*, 1990).

Hacker *et al.* (1995) ont montré par protection à la RNase et RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends-Polymerase Chain Reaction) la présence de deux promoteurs de transcription pour Sry : l'un distal, spécifique des cellules germinales du testicule adulte et l'autre proximal, spécifique des cellules somatiques des crêtes génitales. Les transcrits de grande taille synthétisés à partir du promoteur distal se présentent sous forme circulaire du fait de l'organisation particulière en "tandem répété inversé" du gène sry murin (Capel *et al.*, 1993), et ne sont sans doute pas traduits. Le rôle de cet ARNm est inconnu. Le promoteur proximal donne naissance à un ARNm de 4,9 Kb présent dans les crêtes génitales et est responsable de la forme active de la protéine.

L'expression de Sry commence à 10,5 j. p. c., est maximale à 11,5 j. p. c. et décline ensuite rapidement (Hacker *et al.*, 1995), ce qui correspond au moment de l'apparition des cordons testiculaires.

Les deux gènes, humain et murin, ne semblent pas porter de séquences régulatrices d'initiation de la transcription : la régulation de l'expression de SRY est encore inconnue. En revanche, l'ARN messager présente chez la souris de nombreuses structures qui pourraient indiquer une régulation post transcriptionnelle active (multiples ATG, séquences micro-satellites dans les régions non traduites, séquences de déstabilisation de l'ARN, plusieurs sites de polyadénylation).

La réalisation de souris transgéniques a apporté la preuve définitive que SRY est le seul gène du chromosome Y nécessaire à la détermination testiculaire. Un clone d'ADN

génomique de 14 Kb portant le gène Sry a été injecté dans des oeufs fécondés de souris (Koopman *et al.*, 1991). Sur les embryons s'étant développés à terme, une souris présentait un phénotype mâle avec un caryotype femelle. Cette souris avait une morphologie et un comportement mâles normaux mais il y avait très peu de cellules germinales et pas de spermatogénèse.

Ainsi, un fragment d'ADN génomique de 14 Kb portant le gène Sry est suffisant pour déterminer une différenciation sexuelle complète, la spermatogénèse ne pouvant cependant pas s'effectuer normalement du fait de l'absence des autres gènes du chromosome Y.

2.3.3- SRY et inversion sexuelle.

Les femmes XY présentent un caryotype XY avec un phénotype féminin, sans testicule. Certains de ces cas de dysgénésie gonadique complète ont pu être expliqués par la présence de mutations dans la séquence codante de SRY (Berta *et al.*, 1990 ; Jäger *et al.*, 1990).

Dans environ 20% des cas de dysgénésie gonadique, des mutations ont été identifiées dans la boîte HMG de SRY (Hawkins, 1993 ; Poulat *et al.*, 1994) ; peu de mutations ont été décrites dans les autres régions de SRY : une mutation dans le domaine C-terminal (Tajima *et al.*, 1994) et une délétion en 5' (McElreavey *et al.*, 1992).

Les autres cas de dysgénésie gonadique pourraient sans doute être expliqués par des mutations dans d'autres gènes de la détermination sexuelle.

2.3.4- Rôle.

Le mode d'action biochimique de la protéine SRY est encore peu connu : ses propriétés de liaison à l'ADN ont été étudiées en comparaison avec les autres protéines à HMG-box.

SRY se lie spécifiquement à la séquence AACAAAG *in vitro* (Harley *et al.*, 1992) comme deux autres facteurs de transcription à HMG-box, TCF1 qui active la transcription du gène codant pour la sous-unité CD3ε dans les lymphocytes T (van de Wetering *et al.*, 1991) et *stl1* qui régule la transcription des gènes de la différenciation sexuelle chez la levure (Sugimoto *et al.*, 1990), alors que le degré de similarité de ces deux boîtes HMG avec celle de SRY est faible (48 et 42% en acides aminés). Une autre séquence similaire A/TAACAAT a été identifiée comme site de liaison de SRY (Harley *et al.*, 1994).

SRY possède également une forte affinité pour l'ADN cruciforme comme la protéine HMG1, et ce, sans spécificité de séquence. Une fois fixée sur son site spécifique, la protéine SRY provoque une courbure dans l'ADN formant ainsi un angle droit similaire à celui observé dans l'ADN cruciforme (Ferrari *et al.*, 1992). Un cas d'inversion sexuelle due à une mutation dans SRY semble dériver de l'absence de la capacité à courber l'ADN de la protéine SRY mutante (Pontiggia *et al.*, 1994). En l'absence de domaine d'activation de la transcription connu chez la protéine SRY humaine, la courbure de l'ADN pourrait constituer le mode d'action

biochimique de SRY qui faciliterait ainsi l'assemblage de complexes nucléoprotéiques.

La recherche des gènes cibles de SRY impliqués dans la différenciation sexuelle est en plein développement. Cette recherche est difficile, compte tenu de la faible spécificité de liaison des protéines à domaine HMG et de la richesse du génome en motifs de liaison de SRY, AACAAAT : environ 10⁵ chez l'homme (Goodfellow et Lovell-Badge, 1993).

Des sites potentiels de fixation de SRY ont été découverts dans les régions promotrices des gènes codant pour l'aromatase et l'AMH (Haqq *et al.*, 1993). De plus, les mêmes auteurs ont montré que l'expression de SRY dans une lignée de cellules testiculaires embryonnaires initie indirectement la transcription de l'AMH (Haqq *et al.*, 1994). Ceci semble être confirmé par l'étude de l'expression des deux gènes : chez la souris, les transcrits de l'*Amh* apparaissent au moment où l'expression de *Sry* est maximale (Hacker *et al.*, 1995).

Des interactions de la protéine SRY ont aussi été proposées avec les produits des gènes SOX9 et SF1 ; SRY se lierait avec SF1 pour activer la transcription de l'AMH ; les études sont en cours.

2.3.5- Conservation de SRY chez les Mammifères.

Le gène SRY a été isolé en totalité chez l'homme (Sinclair *et al.*, 1990), la souris (Gubbay *et al.*, 1990), le lapin (Sinclair *et al.*, 1990), le kangourou (Foster *et al.*, 1992) et le taureau (Daneau *et al.*, 1995). Les séquences

protéiques déduites de ces gènes montrent une très faible conservation, à l'exception du domaine HMG. L'extrémité carboxyterminale est, par exemple, très différente entre l'homme et la souris : la protéine murine est plus longue (395 acides aminés pour 204 pour la protéine humaine) et présente un domaine riche en

glutamine et histidine, fonctionnant comme une région activatrice de la transcription qui n'existe pas dans la protéine humaine. Le gène SRY semble ainsi soumis à une évolution rapide, y compris entre les espèces d'un même Ordre, comme par exemple, chez les Rongeurs (Tucker et Lundrigan, 1993).

2.4- Les gènes Sox.

2.4.1- Isolement.

En même temps que Sry, quatre autres gènes apparentés ont été clonés à partir d'une banque d'ADNc d'embryon de souris de 8,5 jours (Gubbay *et al.*, 1990). Ces gènes codent également pour des protéines à domaine HMG. Sur la base de l'importante homologie de leur domaine HMG avec celui de SRY (supérieure à 60% en acides aminés), ces gènes ont été dénommés Sox pour "SRY-box containing genes".

Depuis, de telles séquences n'ont cessé d'être isolées dans de nombreuses espèces de Vertébrés et chez un Invertébré, la drosophile. En effet, grâce à la technique de PCR avec des amorces dégénérées ciblées sur les extrémités du domaine SRY-box, le nombre de domaines Sox identifiés s'est considérablement accru (Fig.1) :

- chez la souris, 18 gènes Sox différents sont connus : Sox1-4 ont été les premiers isolés par Gubbay *et al.* (1990). Sox5 a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de testicule (Denny *et al.*, 1992b) comme les autres domaines Sox à partir de différentes

- banques d'ADNc d'embryons de souris, Sox6 et 7 (Denny *et al.*, 1992a), Sox8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14 (Wright *et al.*, 1993), à partir d'ADNc de lymphocytes T, Sox15 (van de Wetering et Clevers, 1993), à partir d'une banque de moelle osseuse, Sox16 (Layfield *et al.*, 1994), et à partir d'une banque d'ADNc de coeur et de muscle, Sox17 et Sox18 (Dunn *et al.*, 1995).

- chez l'homme, un gène nouveau a été découvert, SOX20 (Meyer *et al.*, 1996) ainsi que des séquences homologues des gènes murins : SOX4, 5, 8, 9 et 10 (Denny *et al.*, 1992a), SOX2 (Stevanovic *et al.*, 1994), SOX3 (Stevanovic *et al.*, 1993) et SOX11 et 12 (Gozé *et al.*, 1993).

- chez le kangourou, l'homologue du gène Sox3 a été cloné (Foster et Marshall-Graves, 1994).

- chez les oiseaux, la mouette *Larus fuscus* a été la première espèce en dehors de l'homme et de la souris où des domaines Sox ont été découverts. La

comparaison des six domaines isolés, SoxL1-6 (Sox *Larus fuscus*), avec ceux de la souris avait déjà permis d'établir la notion de sous-famille à l'intérieur des gènes Sox (Griffiths, 1991). Chez le poulet, les homologues des gènes Sox2, Sox3 et Sox11 ainsi que d'autres domaines Sox ont aussi été isolés (Coriat *et al.*, 1993 ; Uwanogho *et al.*, 1995).

- chez les Reptiles, toujours par PCR, de nombreux domaines Sox ont été clonés chez l'alligator, chez deux espèces de gecko (Coriat *et al.*, 1993) et chez la tortue *Chelydra serpentina* (Spotila *et al.*, 1994).

- chez le poisson-zèbre, un gène Sox, ZfSox19 présente une forte homologie avec Sox1, Sox2 et Sox3 (Vriz et Lovell-Badge, 1995) et chez la truite, un gène Sox, SoxP1 est exprimé dans l'hypophyse et dans les gonades (Ito *et al.*, 1995).

- enfin, chez les Invertébrés, des domaines Sox ont été isolés chez la drosophile (Denny *et al.*, 1992a ; Coriat *et al.*, 1993).

Suivant leurs homologies, ces gènes ont été classés en six sous-familles : A, B, C, D, E et F (Fig. 1) (Wright *et al.*, 1993).

2.4.2- Rôle des gènes Sox.

Les séquences connues de la plupart de ces gènes se limitent au domaine HMG : peu d'ADNc ont été isolés en entier. Mais, pour certains, de plus en plus nombreux, le reste de la séquence ainsi que le profil d'expression

sont connus. Ces gènes semblent intervenir dans des processus de différenciation variés :

- chez la souris, Sox1, 2 et 3 sont exprimés au cours du développement du système nerveux ; de même chez le poulet, Sox2, 3 et 11 semblent jouer un rôle dans le développement nerveux (Uwanogho *et al.*, 1995). Chez l'homme, SOX3 est fortement exprimé dans le cerveau foetal et son dysfonctionnement pourrait être lié à un syndrome de retard mental, le syndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann (Stevanovic *et al.*, 1993). SOX11 chez l'homme présente également un fort taux d'expression dans le système nerveux foetal (Jay *et al.*, 1993).

- la protéine Sox4 est exprimée chez la souris dans les lignées de lymphocytes T et préB et dans le thymus où elle intervient dans le contrôle des gènes spécifiques des lymphocytes T (van de Wetering *et al.*, 1995).

- Sox5 code chez la souris une protéine exprimée dans le testicule dans les cellules germinales post-méiotiques et qui serait impliquée dans le contrôle de la spermatogenèse (Denny *et al.*, 1992b).

- de même, Sox6, toujours chez la souris, est fortement exprimé dans le testicule adulte, mais également dans les structures antérieures du système nerveux en développement (Connor *et al.*, 1995).

- SOX9 chez l'homme intervient dans le développement osseux et dans le contrôle du développement testiculaire. Des mutations de SOX9 sont associées aux syndromes de dysplasie campomélique

| | | 1 | 1 1 | 2 1 | 3 1 | 4 1 | 5 1 | 6 1 | 7 1 |
|--|---------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| | CKCH1 | Poulet | | MALENPKMHN | SEISKRLGAE | WKQLSEAEKR | PFIDEAKRHR | AMHMKEYPDY | KYRP |
| | CKCH7 | Poulet | | | | | | | |
| | AMA3 | Alligator | | | | | | R | |
| | CKCH31 | Poulet | | Q | | L | | | |
| | AMA2 | Alligator | | | | L | | | |
| | CKCH4 | Poulet | | Q | | L | | | N |
| | AMA1 | Alligator | | Q | | L | DS | | |
| | CKCH2 | Poulet | | Q | V | L | S | | |
| | CKCH60 | Poulet | | Q | M | L | | S | |
| | CKCH32 | Poulet | | Q | | L | DS | Q | |
| | DM17 | Drosophile | | | Q | L | | Y | E |
| | Sox11 | Mouette | | | | L | | Y | |
| | Sox12 | Mouette | MVCSRGQRRK | | | L | | | |
| | CSox3 | Poulet | DRVKRPMNAF | | | L | | | |
| | Sox13 | Mouette | | | D | L | D | | |
| | DM64 | Drosophile | | | D | L | D | | |
| | DM23 | Drosophile | | | | L | S | | |
| | DM33 | Drosophile | | | | L | A | | |
| | DM36 | Drosophile | | | | L | A | | |
| | DM10 | Drosophile | | Q | H | L | AAS | | NH |
| | DM63 | Drosophile | | Q | | L | ADS | | N |
| | M6P | Souris | | Q | | L | A | | N |
| | M4P | Souris | | Q | | VM | | | H |
| | Sox1 | Souris | | Q | D | L | T | | H |
| | CSox2 | Poulet | | Q | | VM | | | H |
| | SOX2 | Homme | | Q | | I | | I | H |
| | Sox2 | Souris | | Q | | L | T | | H |
| | Sox14 | Souris | | Q | | L | T | | H |
| | M5P | Souris | | Q | | L | | Y | Q |
| | SOX10 | Homme | A | Q | | L | | Y | Q |
| | ZfSox19 | Poisson-zèbre | | Q | | L | T | | H |
| | M8P | Souris | | | | G | L | TD | |
| | SOX3 | Homme | | | | D | L | TD | |
| | Sox3 | Souris | | | | D | L | TD | |
| | SmSox3 | Sminthopsis m. | | | | D | L | TD | |
| | XSox11 | Xénope | | Q | | D | L | DS | |
| | Sox15 | Souris | S | V | Q | Q | L | GDE | ME |
| | SoxB12 | Boeuf | | Q | Q | Q | L | G | D |
| | Sox16 | Souris | | S | A | Q | Q | L | DDE |
| | SOX20 | Homme | E | K | S | A | Q | Q | L |
| | SOX12 | Homme | | S | A | Q | H | L | D |
| | bSry | Boeuf | | | | R | R | Q | Y |
| | SRY | Homme | | I | D | R | R | Q | Y |
| | rSry | Lapin | E | | Q | H | Q | Q | Y |
| | Sry | Souris | G | H | E | H | L | Q | S |
| | SmSry | Sminthopsis m. | | S | Q | T | V | Q | VT |
| | MeSry | Macropus e. | | I | S | V | H | FT | M |

Fig. 1 : Compilation des différents domaines HMG des gènes Sox.

| | | | | | | | | | | |
|--|--------|----------------|------------|----------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|
| | CKCH1 | Poulet | | | MALENPKMHN | SEISKRLGAE | WKQLSEAEKR | PFIDEAKRHR | AMHMKEYPDY | KYRP |
| | SOX5 | Homme | | AKDE... | ILQAF.D... | .N...I...SR | .AMTNL..Q | .YYE.QA.LS | KQ.LEK. | |
| | Sox5 | Souris | | AKDE... | ILQAF.D... | .N...I...SR | .AMTNL..Q | .YYE.QA.LS | KQ.LEK. | |
| | XSox5 | Xénope | | AKDE... | ILQAF.D... | .N...I...SR | .SMTNL..Q | .YYE.QA.LS | KQ.LEK. | |
| | SOX6 | Homme | | A.DE... | ILQAF.D... | .N...I...SR | .SM.NQ..Q | .YYE.QA.LS | KI.LEK. | |
| | Sox6 | Souris | PHI..... | AKDE... | ILQAF.D... | .N...I...SR | .SM.NQ..Q | .YYE.QA.LS | KI.LEK. | |
| | Sox13 | Souris | | AKDE... | ILQAF.D... | .S...I...SR | .SMTNQ..Q | .YYE.QA.LS | RQ.LEK | |
| | XSox12 | Xénope | | AKDE... | ILQAF.D... | .S...I...SR | .SM.NG..Q | .YYE.QA.LS | RQ.LER. | |
| | Sox7 | Souris | | AKDE.KR | L.VQN.DL.. | A.L..M..KS | .A.TLSQ.. | .YV...E.L. | LQ..QD. | |
| | Sox17 | Souris | | AKDE.KR | L.QQN.DL.. | A.L..M..KS | .E.NT.... | .VE...E.L. | VQ..QD | |
| | Sox18 | Souris | LRIRP..... | AKDE.KR | L.QQN.DL.. | AVL..M..KA | .E.NT.... | .VE...E.L. | VQ.LRDH.N. | .Q....KQ |
| | SOX8 | Homme | | AKDE.KR | L.QQN.DL.. | AVL..M..KA | .E.NA.... | .E...E.L. | VQ.LRDH | |
| | DSox15 | Drosophile | | AKJE.K. | L.D...DL.. | ADL..M..KK | .RS.TPQDR. | .YVE...E.L. | V.I..T.H | |
| | Sox10 | Souris | | AQAAP.. | L.DQY.HL.. | A.L..T..KL | .RL.N.SD.. | .E...E.L. | MQ.K.D | |
| | Sox8 | Souris | | AQAA... | L.DQY.HL.. | A.L..T..KL | .RL.N.S... | .VE...E.L. | VQ.K.D | |
| | SOX9 | Homme | HVK..... | AQAA... | L.DQY.HL.. | A.L..T..KL | .RL.N.S... | .VE...E.L. | VQ.K.DH.... | .Q....RKS |
| | Sox9 | Souris | | AQAA... | L.DQY.HL.. | A.L..T..KL | .RL.N.S... | .VE...E.L. | VQ.K.D | |
| | SoxP1 | Truite | PHV..... | AQAA... | L.DQY.HL.. | A.L..T..KL | .RL.N.S... | .VE...E.L. | VQ.K.DH.... | .Q....RKS |
| | Sox4 | Souris | GHI..... | QIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KDSD.I | .Q...E.L. | LK..AD.... |V.S |
| | Sox14 | Mouette | | QIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KDSD.I | .R...E.L. | LK..AD | |
| | SOX4 | Homme | GHI..... | PJE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KDSD.I | .R...E.L. | LK..AD.... |K.V.S |
| | SOX11 | Homme | GHI..... | KIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .M.KDS.I | .R...E.L. | LK..AD.... |K.P. |
| | Sox11 | Souris | | KIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .M.KDS.I | .R...E.L. | LK..AD | |
| | CSox11 | Poulet | GHI..... | KIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .M.KDS.I | .R...E.L. | LK..AD.... |K.P. |
| | Sox16 | Mouette | | KIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KDS.I | .R...E.L. | LK..AD | |
| | XSox13 | Xénope | | KIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .M.NDS.I | .R...E.L. | LK..AD | |
| | AF94 | Alligator | | QIF | IMEQS.D | A.....KR | .I.KDS.I | .R.F.I | IK..AD | |
| | TSox4 | Tortue | | QIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KDSD.I | .R...E.L. | LK..AD | |
| | TSox1 | Tortue | | QNE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KDSD.I | .R...E.L. | LK..AD | |
| | AES1 | Alligator | | QIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KGSD.I | .R...E.L. | LK..AD.... | |
| | AES2 | Alligator | | G.QIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KGSD.I | .R...E.L. | IK..AD.... | |
| | TSox3 | Tortue | | QIE... | IMEQS.D... | A.....KR | .L.KDSD.I | .R...E.L. | LK..ED | |
| | AES6 | Alligator | | QSRAG. | IMEQS.D... | A.....R.KR | .L.KDSD.I | .R.A.E.L. | LK..AD.... | |
| | TSox2 | Tortue | | QNE... | IMDQW.D... | A.....KR | .L.KDSD.I | .R...E.L. | LK..AD | |
| | TSox7 | Tortue | | QNE... | IMDQW.D... | A.....KR | .L.KDSD.I | .R...EDG | | |
| | TMG44 | Gecko | | QNE... | IMDQW.D... | A.....SL.RS | .SQL.QDS.I | .VKE.G.L. | LK..AD..N. | |
| | TMG42 | Gecko | | QNE... | IMDQW.D... | A.....RP | .QL.QDS.I | .VK.G.L | VK..AD..N. | |
| | TMG43 | Gecko | | QNE... | IMDQW.D... | A.....E.RR | .QL.QDS.I | .VK.G.L | LK..AD.... | |
| | LG28 | Eublepharis m. | | QNE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.I | .VK.S-V | LK..AD.... | |
| | LG27 | Eublepharis m. | | QNE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.RY | .LSRRRS-V | LK..AD..N. | |
| | ADW4 | Alligator | | QHE... | IMDQW.D... | A.....RR | .EL.QDS.I | .VK.DGLL | LK..AD..N. | |
| | ADW5 | Alligator | | QHE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.I | .VK.GGL | L..AD.... | |
| | ADW2 | Alligator | | QHE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.I | .VKG.E.L. | LK..AD.A... | |
| | Sox15 | Mouette | | QHE... | IMEQS.D... | A.....RR | .QL.HDS.I | .IR..E.L. | LK..AD | |
| | Sox12 | Souris | | QHE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.I | .ER...E.L. | LK..AD | |
| | TSox5 | Tortue | | QNE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.I | .VK.DMAA | QA.GGL | |
| | TSox6 | Tortue | | QNE... | IMDQW.D... | A.M.....RR | .QL.QDS.I | .VK.DCGS | | |
| | TSox8 | Tortue | | QNE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.I | .VK.DMAA | QS.G | |
| | TSox9 | Tortue | | QNE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.I | .VKDGNAEA | QA.G | |
| | TSox10 | Tortue | | QNE... | IMDQW.D... | A.....RR | .QL.QDS.I | .VQGGGTAA | QA.G | |
| | DSox14 | Drosophile | | QME... | ICERT.DL.. | A.....E..RR | .QL..KDD.Q | .Y.I..EKL. | KL..I.. | |

(CMPD1) et d'inversion sexuelle autosomique (SRA1) (Wagner *et al.*, 1994 ; Foster *et al.*, 1994).

2.4.3- Mode d'action.

Les gènes homologues clonés dans différentes espèces présentent une forte conservation du domaine HMG mais aussi du reste de la séquence, contrairement à SRY. Dans chaque cas où elle a été étudiée, la spécificité de liaison à l'ADN des protéines Sox est la même : tous ces facteurs de transcription sont capables de lier spécifiquement *in vitro* la séquence AACAAAT, très répandue dans le génome.

En l'absence de site de liaison bien spécifique, la spécificité des interactions des protéines Sox sur leurs séquences cibles doit être assurée par une expression spatiotemporelle bien définie et par des interactions avec d'autres protéines présentes dans les mêmes cellules.

Il en est ainsi de SRY qui initie indirectement la transcription de l'AMH dans une lignée de cellules testiculaires embryonnaires (Haqq *et al.*, 1994).

De même, chez le poulet, cSox2 active la transcription de la cristalline $\delta 1$ dans les cellules du cristallin, mais pas dans les fibroblastes, ce qui montre que cSox2 agit de concert avec une autre protéine présente dans les cellules du cristallin (Kamachi *et al.*, 1995).

Chez la souris, au début de l'embryogenèse, Sox2 active la transcription

du facteur de croissance FGF4 (Fibroblast Growth Factor 4) en formant sur le promoteur du gène un complexe spécifique avec la protéine à homéodomaine Oct3 (Octamer binding protein) (Yuan *et al.*, 1995).

Certaines protéines Sox comme la protéine SRY humaine activent la transcription en courbant l'ADN de façon à faciliter l'assemblage de complexes nucléoprotéiques ; alors que d'autres, comme par exemple les protéines murines Sry, Sox4, Sox5 et Sox6 possèdent un domaine transactivateur. Cette action directe sur la transcription a été démontrée notamment pour Sox4 : le domaine C-terminal riche en sérine de cette protéine, couplé à un autre domaine de liaison à l'ADN (GAL4) est suffisant à lui seul pour stimuler la transcription d'un gène "reporter" (van de Wetering *et al.*, 1993).

Comme pour SRY, l'identification des gènes cibles est difficile : une des cibles potentielles de SRY semble être le gène de l'AMH ; Sox2 chez la souris active la transcription du FGF4 au cours de l'embryogenèse précoce et des cristallines au cours du développement de l'oeil ; Sox4, toujours chez la souris, stimule l'expression de TCR α , CD3 ϵ et CD4 au cours de la différenciation lymphocytaire.

2.4.4- SOX9.

Plusieurs loci autosomaux chez l'homme sont connus pour être associés avec des perturbations de la différenciation sexuelle. Récemment, sur le chromosome 17, un gène a

été identifié et impliqué dans un syndrome de malformation osseuse (la dysplasie campomélique, CMPD) souvent accompagné de dysgenèse gonadique (femmes XY) (Wagner *et al.*, 1994 ; Foster *et al.*, 1994). Ce gène, SOX9, fait partie de la famille des gènes Sox et code pour une protéine contenant, en plus du domaine Sox, un domaine riche en proline et en acide glutamique semblable aux domaines transactivateurs trouvés dans d'autres facteurs de transcription.

Les patients atteints de dysplasie campomélique qui ont été analysés, présentent tous des translocations avec des points de cassure à proximité de SOX9 ou des mutations au niveau du gène entraînant la perte de la fonction de la protéine. La majorité des individus mutants sont hétérozygotes, ce qui indique que les deux syndromes résultent d'une dose trop faible de la protéine fonctionnelle (haploinsuffisance).

Ces mutations sont compatibles avec un développement féminin normal chez les individus XX, alors qu'elles entraînent la plupart du temps une inversion sexuelle chez les individus XY.

Dans les gonades embryonnaires chez la souris, l'expression de Sox9 débute à 10 jours p.c. (Fig. 2), puis elle augmente chez les

mâles et diminue chez les femelles à 11,5 j.p.c. : cette expression est corrélée avec la différenciation des cellules de Sertoli chez la souris et chez le poulet (Morais da Silva *et al.*, 1996). En effet, Sox9 semble être conservé chez tous les vertébrés. En dehors des gonades, Sox9 est également exprimé dans les chondrocytes du tissu cartilagineux, le cœur et le système nerveux central (Wright *et al.*, 1995).

Sox9 semble associé chez la souris au phénotype mutant Ts (tail short) dont les symptômes se manifestent par des anomalies du squelette, notamment une queue courte et recourbée, des défauts cardiaques et nerveux. Ces mutants Ts pourraient constituer un bon modèle animal du campomélisme. Il est intéressant de noter que, chez ces animaux, il n'y a pas d'inversion sexuelle. Cependant, une étude récente semble exclure Sox9 comme origine du phénotype Ts (Uchida *et al.*, 1996).

SOX9 pourrait être exprimé au cours du développement dans les cellules mésenchymateuses du mésonéphros : ces cellules sont en effet requises à la fois pour la formation des cordons testiculaires et pour la formation du cartilage, ce qui expliquerait la liaison entre les deux syndromes.

2.5- L'AMH.

Les travaux de Jost avaient démontré l'existence d'une hormone responsable de la dégénérescence des canaux de Müller. Grâce à cette propriété utilisée en culture d'organes, cette hormone put être purifiée (Picard et

Josso, 1984) et son ADNc isolé (Cate *et al.*, 1986 ; Picard *et al.*, 1986).

L'hormone anti-müllérienne est un homodimère glycoprotéique faisant partie de la famille des facteurs de croissance TGF β

(Transforming Growth Factor). L'AMH est produite par les cellules somatiques des gonades, cellules de Sertoli et cellules de la granulosa, et est responsable de la régression des canaux de Müller dans l'embryon mâle.

L'expression dans les cellules de Sertoli débute chez la souris à 12,5 j. p. c., soit au moment de la formation des cordons séminifères, jusqu'à la puberté, avec une forte décroissance après la naissance. Dans les ovaires, l'expression de l'AMH est faible et débute dans les cellules de la granulosa quelques jours après la naissance (Münsterberg et Lovell-Badge, 1991).

Ainsi, l'AMH doit être exprimée à un moment bien déterminé, chez les mâles, avant

la fin de la période de sensibilité des canaux à l'AMH ; et chez les femelles, il ne doit pas y avoir d'exposition à l'AMH tant que les gonades et les canaux sont capables d'y répondre.

Des souris transgéniques exprimant l'AMH tôt au cours du développement montrent, pour les femelles, l'absence de canaux de Müller (utérus et oviductes), et des ovaires masculinisés sans cellules germinales (Berhinger *et al.*, 1990). En effet, l'AMH provoque la formation de structures semblables aux cordons séminifères dans des ovaires foetaux de rat en culture (Vigier *et al.*, 1987).

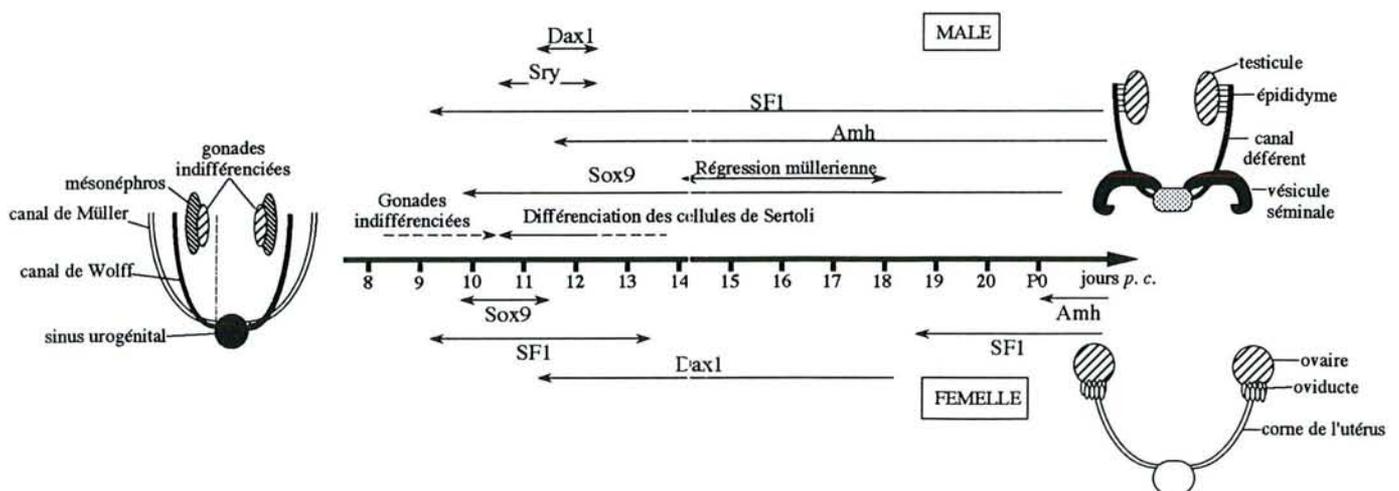


Fig.2 : Représentation schématique de l'expression des principaux gènes de la différenciation sexuelle au cours de l'embryogenèse chez la souris.

Il a été également observé pour 25% des souris mâles transgéniques avec un fort taux d'expression de l'AMH, une féminisation des organes génitaux externes, ce qui a été interprété comme une altération de la fonction des cellules de Leydig, se traduisant par une déficience en androgènes (Berhinger *et al.*, 1990)

De plus, l'AMH inhibe la synthèse de l'aromatase dans l'ovaire foetal de plusieurs espèces dont des espèces non mammaliennes comme le poulet et la tortue (di Clemente *et al.*, 1992). L'AMH inhibe aussi la synthèse de l'aromatase et du récepteur de la LH (Luteinizing Hormone) dans les cellules de la granulosa après la naissance chez le rat (di Clemente *et al.*, 1994a).

Tous ces arguments plaident pour une intervention de l'AMH dans la différenciation testiculaire.

L'inactivation du gène de l'Amh a permis d'observer le phénotype de souris déficientes en AMH (Berhinger *et al.*, 1994). Les souris mâles présentent un développement de toutes les structures dérivées des canaux de Müller avec un développement testiculaire

normal. La production de gamètes est normale dans les deux sexes.

En revanche, les souris mâles âgées présentent une hyperplasie des cellules de Leydig, ce qui indique que l'AMH serait un régulateur négatif de la prolifération de ces cellules. Cette régulation serait indirecte car le récepteur de l'AMH est localisé dans les cellules mésenchymateuses autour des canaux de Müller et dans les gonades adultes, en particulier au niveau des cellules de Sertoli mais pas au niveau des cellules de Leydig (di Clemente *et al.*, 1994b).

Le phénotype de ces souris ressemble à celui des patients humains atteints du syndrome PMDS (Persistent Müllerian Ducts Syndrome).

Ce syndrome se caractérise par un pseudohermaphrodisme mâle où l'on observe le développement d'un utérus et de trompes, ainsi qu'une cryptorchidie, chez des mâles. Dans 50% des cas, il a été observé une mutation au niveau du gène de l'AMH (Knebelmann *et al.*, 1991 ; Imbeaud *et al.*, 1994).

Les autres cas pourraient être expliqués par une insensibilité à l'AMH causée par une mutation du gène du récepteur de l'AMH.

2.6- SF1.

L'expression des enzymes de la stéroïdogénèse est régulée par différents facteurs, notamment par un récepteur nucléaire orphelin, SF1 (Steroidogenic Factor 1). Ce récepteur nucléaire est l'homologue de fushi

tarazu-factor 1 (FTZ-F1) qui, chez la drosophile, régule l'expression de l'homéogène fushi tarazu (Lala *et al.*, 1992).

Ce gène codé chez la souris pour deux produits, ELP (Embryonal Long terminal

repeat binding Protein) qui est exprimé jusqu'à 9 jours *p. c.* et joue un rôle dans le développement précoce, et SF1 qui est exprimé dans les tissus stéroïdogéniques (Ikeda *et al.*, 1993).

L'expression de SF1 débute dans l'embryon de souris dans les crêtes urogénitales à 9 jours (Fig. 2), ce qui correspond au stade le plus précoce de l'organogenèse gonadique. A 11 jours, lors de la séparation des territoires présomptifs gonadiques et surrénaliens, les ARNm se situent dans toute la surrénale avant de se localiser au niveau du cortex. Au cours des stades gonadiques indifférenciés, SF1 est exprimé dans les crêtes génitales puis, lors de la formation des cordons testiculaires, l'expression persiste dans tout le testicule alors que pour l'ovaire, elle disparaît entre 13,5 et 16,5 jours pour réapparaître vers 18,5 jours (Ikeda *et al.*, 1994). Ainsi, l'expression de SF1 dans les gonades en différenciation est dimorphique selon le sexe, ce qui présume pour SF1 un rôle plus large que la régulation des enzymes de la stéroïdogénèse.

En effet, Luo *et al.* (1994) ont montré par des expériences d'inactivation du gène FTZ-F1 chez la souris, l'importance de ce gène dans la différenciation sexuelle.

L'inactivation de SF1 entraîne une agénésie gonadique et surrénalienne : les animaux FTZ-F1 *-/-* souffrent à la naissance d'insuffisance surrénalienne et ne peuvent

survivre que grâce à une injection journalière de corticoïdes. Ces animaux n'ont ni glandes surrénales ni gonades et se différencient tous en femelles : des oviductes ainsi qu'un utérus et un vagin normaux se développent. SF1 agit également au niveau des fonctions gonadotropes : chez les souris FTZ-F1 *-/-*, on observe au niveau de l'hypophyse la disparition de marqueurs spécifiques des interactions avec les gonades comme la LH β , la FSH β et le récepteur de la GnRH (Ingraham *et al.*, 1994). Ces souris n'ont pas non plus de noyau hypothalamique ventromédian qui est impliqué dans le comportement reproducteur femelle (Ikeda *et al.*, 1995).

SF1 régule l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse, notamment celle de l'aromatase dans l'ovaire chez le rat et chez l'homme (Lynch *et al.*, 1993 ; Dodson Michael *et al.*, 1995).

De plus, SF1 régule également l'expression de l'AMH dans les cellules de Sertoli : SF1 est capable de se fixer spécifiquement sur le promoteur du gène de l'AMH et d'en activer la transcription. Cependant, cette activation nécessite la présence du ligand de SF1 ou d'un cofacteur spécifique des cellules de Sertoli. Cette activation est en accord avec les profils d'expression des deux gènes qui se superposent bien dans l'embryon mâle au cours de la différenciation sexuelle (Shen *et al.*, 1994).

2.7- Duplication du Xp et inversion sexuelle.

Des duplications partielles du bras court du chromosome X ont été décrites dans des cas d'inversion sexuelle chez des femmes XY portant un gène SRY normal. Pour expliquer la conséquence d'une duplication sur la différenciation sexuelle, Ogata *et al.* (1992) ont proposé que l'inversion sexuelle était due à l'existence de deux copies actives d'un (ou plusieurs) gène(s) normalement soumis au phénomène d'inactivation du chromosome X.

Bardoni *et al.* (1994) ont pu identifier un patient portant une microduplication en Xp21.3, définissant ainsi une région de 160 kb portant le locus DSS (Dosage Sensitive Sex reversal). Dans cette région, se situent également les loci, peut-être identiques à DSS, responsables de deux syndromes, l'hypoplasie surrénalienne congénitale liée au chromosome X, AHC (Adrenal Hypoplasia Congenita), et l'hypogonadisme hypogonadotrophique, HHG.

Récemment, un gène, DAX1 (DSS-AHC critical region on the X chromosome gene 1) a été identifié dans cette région. DAX1 code pour un récepteur hormonal nucléaire d'un nouveau type : l'extrémité C-terminale montre une homologie avec le domaine E des récepteurs hormonaux qui correspond au domaine de liaison au ligand, tandis que l'extrémité N-terminale comporte 4 répétitions d'un motif riche en alanine et en glycine capable de se lier à l'ADN (Zanaria *et al.*, 1994).

Une étude de patients atteints des deux pathologies AHC et HHG a montré que DAX1 était délété chez 14 de ces patients et portait une mutation chez 12 autres, démontrant ainsi que DAX1 est bien responsable de ces maladies (Muscatelli *et al.*, 1994). Chez l'homme, l'absence de DAX1 n'empêche pas les stades initiaux du développement gonadique mais les surrénales ne se développent plus après les stades foetaux. DAX1 jouerait donc un rôle plus tardif que celui de SF1 dans l'organogenèse surrénalienne. SF1 pourrait réguler directement l'expression de DAX1, il est capable de lier efficacement un site de liaison présent dans le promoteur de DAX1 (Burriss *et al.*, 1995). Muscatelli *et al.* n'ont pas réussi à détecter de réarrangement de DAX1 chez 30 femmes 46,XY.

Chez la souris, Dax1 est exprimé dans les cellules somatiques des crêtes génitales à 11,5 j.p.c. ce qui coïncide avec l'expression de Sry chez les mâles. A 12,5 j.p.c., l'expression de Dax1 s'éteint dans le testicule en différenciation alors qu'elle persiste chez la femelle (Swain *et al.*, 1996).

Récemment, trois autres gènes ont été isolés dans l'intervalle DSS de 160 kb, MAGE-Xp (Muscatelli *et al.*, 1995) et DAM6 et DAM10 (DSS/AHC critical interval genes, belonging to the MAGE superfamily), ce dernier étant presque identique à MAGE-Xp (Dabovic *et al.*, 1995).

Ces gènes font partie d'une famille d'au moins cinq gènes organisés en cluster en Xp21. Ils présentent une homologie avec la famille des gènes MAGE qui sont tous situés en Xq27-Xqter. Ces gènes MAGE codent des protéines dont la fonction est encore inconnue ; ils sont exprimés à un fort taux dans les tumeurs, mais leur expression dans les tissus normaux adultes est restreinte au testicule et au placenta. Dans les tumeurs, ces protéines constituent des antigènes tumoraux reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques.

Chez l'homme, MAGE-Xp est exprimé également dans le testicule adulte mais aucune expression n'a été détectée dans des tissus tumoraux ; DAM6 et DAM10, en revanche, sont exprimés en plus du testicule adulte dans des tumeurs pulmonaires.

L'éventuelle intervention des gènes MAGE situés en Xp dans l'inversion sexuelle dosage-dépendante reste une question en suspens.

3- L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA DETERMINATION SEXUELLE.

3.1- Chez les Amphibiens.

L'influence de la température sur la différenciation sexuelle chez les Amphibiens a été soupçonnée très tôt puisque dès 1914, Witschi a observé chez *Rana temporaria* et *Rana sylvatica* des modifications histologiques des gonades et une déviation du sex ratio suite à un élevage des têtards à une température élevée (Witschi, 1914 ; 1929). Plus tard, des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres Anoures, *Bufo vulgaris* (Piquet, 1930), *Rana japonica* (Yoshikura, 1959), *Rana catesbeiana* (Hsü et al., 1971) et un Urodèle, *Hynobius retardatus* (Uchida, 1937).

Cependant, du fait de l'existence de races sexuelles chez les Amphibiens, il peut être difficile de distinguer l'influence de la température de l'évolution normale des gonades lors de la différenciation sexuelle.

Chez les Amphibiens de race sexuelle différenciée, le sex ratio est équilibré à la métamorphose. Mais dans les races sexuelles indifférenciées, comme *Rana temporaria*, les mâles présentent transitoirement des gonades femelles avant une phase d'intersexualité puis un développement testiculaire. Ainsi, dans ces espèces, à la métamorphose, tous les individus apparaissent comme possédant des ovaires et le résultat de traitements ayant une influence sur la différenciation sexuelle doit être observé bien après la métamorphose.

Jusqu'à présent, l'inversion sexuelle par la température chez les amphibiens n'a été démontrée sans ambiguïté que chez le pleurodèle, de race sexuelle différenciée.

Le Pleurodèle est un Amphibien Urodèle qui vit dans le sud de la péninsule ibérique et en Afrique du Nord (Fig. 3). Introduit en France dans les années 50 par L. Gallien, il est depuis maintenu en élevage en laboratoire. Dans notre élevage à Nancy, les animaux sont élevés dans l'eau courante à $20\pm 2^\circ\text{C}$. En élevage, la période de ponte s'étale de Septembre à Avril et la maturité sexuelle est atteinte entre 12 et 18 mois.

Ces propriétés, ainsi qu'un développement relativement bien connu font du pleurodèle un bon modèle d'étude de la différenciation sexuelle chez les vertébrés.

Mais le mode de déterminisme du sexe constitue le principal intérêt de cet animal : le pleurodèle présente un déterminisme génétique du sexe, bien que la différenciation sexuelle des gonades soit sensible à la température d'élevage et aux hormones sexuelles.

Chez le pleurodèle, il existe un déterminisme génétique du sexe du type

ZZ/ZW. Ainsi, lorsque les larves sont élevées à température ambiante ($20\pm 2^\circ\text{C}$), le sex ratio est de 1.

L'homogamétie mâle (ZZ) a été démontrée par l'analyse des descendance d'individus traités au benzoate d'oestradiol par Gallien (1951) : un mâle génotypique inversé en femelle phénotypique sous l'action d'un traitement au benzoate d'oestradiol pendant sa phase larvaire et croisé avec un mâle standard donne une descendance unisexuée mâle.

L'hétérogamétie femelle (ZW) a été démontrée par l'analyse des descendance d'individus ayant subi des greffes embryonnaires de territoire gonadique, par Collenot (1973) : un greffon de gonade primordiale de femelle ZW transplanté chez un receveur mâle ZZ se développe en testicule. Le receveur du greffon donne une descendance composée de 1/4 de mâles et 3/4 de femelles (25% ZZ, 50% ZW, 25% WW) lorsqu'il est croisé avec une femelle standard ZW.



Fig. 3 : Pleurodèle femelle adulte.

En revanche, des températures élevées sont capables de modifier le sex ratio chez deux espèces très voisines, *Pleurodeles waltl* et *Pleurodeles poireti*.

Chez *P. waltl*, l'élevage des larves à 30°C dévie le sex ratio en faveur des mâles, et des intersexués peuvent être observés. A 32°C, les larves se différencient toutes en mâles phénotypiques : les larves de génotype femelle sont inversées en mâles fonctionnels (Dournon et Houillon, 1984).

Chez *Pleurodeles poireti*, l'effet de la température est inversé par rapport à l'espèce précédente : lors d'un élevage des larves à 30°C, le sex ratio est dévié en faveur des femelles, des larves de génotype mâle ZZ se différencient en femelles phénotypiques

(Dournon *et al.*, 1984). Dans les deux espèces, les animaux inversés sont fertiles.

Pour être efficaces (à 100%), ces traitements thermiques doivent être appliqués pendant une période de deux mois de la vie larvaire, du stade 42 au stade 54 selon la table de développement de Gallien et Durocher (1954) (Fig. 4). Cette période thermosensible correspond à la période de différenciation des gonades avant leur sexualisation histologique (Dournon et Houillon, 1985).

La température inverse donc les femelles en thermonéomâles ZW chez *P. waltl* et les mâles en thermonéofemelles ZZ chez *P. poireti*.

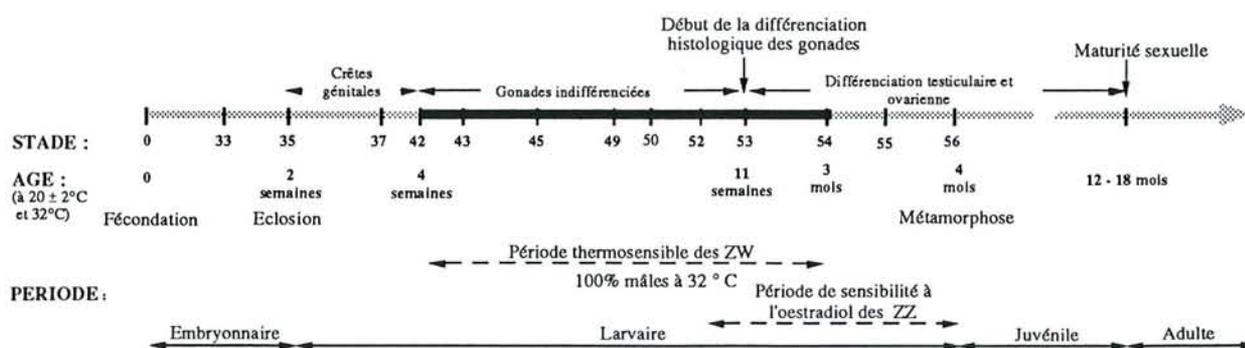


Fig. 4 : axe de développement du pleurodèle waltl.

(D'après Dournon *et al.*, 1990)

3.2- Chez les Reptiles.

Chez les Reptiles, l'influence de la température sur la détermination sexuelle a été décrite chez de nombreuses espèces. Ce phénomène a été découvert pour la première fois par Charnier en 1966 chez le lézard *Agama agama*, puis décrit chez de nombreuses tortues, les rhynchocéphales, quelques lézards et tous les crocodiliens (Bull, 1980 ; Raynaud et Pieau, 1985 ; Janzen et Paukstis, 1991 ; Cree *et al.*, 1995).

On peut ainsi distinguer chez les Reptiles, des espèces où le sexe est déterminé génétiquement (Genetic Sex Determination GSD) et des espèces où la détermination est influencée par la température (Temperature dependent Sex Determination TSD) (Bull, 1980).

Tous les Reptiles vivipares semblent présenter un déterminisme du sexe du type GSD avec des degrés d'hétéromorphisme des chromosomes sexuels divers. De nombreux Reptiles ovipares n'ont pas de chromosomes sexuels et présentent un déterminisme du type TSD. Pour ces derniers, le deuxième tiers de l'incubation correspond à la période thermosensible. Cette période a été déterminée précisément pour cinq tortues, trois crocodiliens et un lézard (Yntema, 1979 ; Bull et Vogt, 1981 ; Pieau et Dorizzi, 1981 ; Yntema et Mrosovsky, 1982 ; Ferguson et Joanen, 1983 ; Bull, 1987 ; Webb *et al.*, 1987).

Trois principaux modes de déterminisme du sexe par la température

existent chez les Reptiles (Bull, 1980 ; Ewert *et al.*, 1994) (Fig. 5) :

- mode Mâle-Femelle (MF) où les températures d'incubation basses donnent des mâles. Ce mode est observé uniquement chez les Chéloniens.

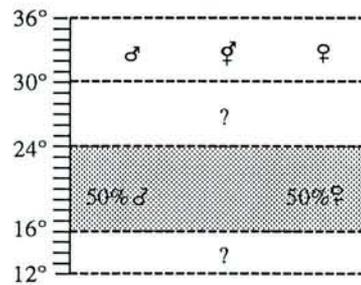
- mode Femelle-Mâle (FM) où les températures d'incubation basses donnent des femelles. Ce mode était observé chez deux lézards et quelques alligators, mais des travaux récents ont inclus l'un des lézards, *Eublepharis macularius* et les alligators dans le troisième mode (Viets *et al.*, 1993 ; Lang et Andrews, 1994). La dernière espèce restante, *Agama agama* est restée peu étudiée depuis les travaux de Charnier en 1966, si bien que l'on ne connaît pas actuellement d'espèce vraiment caractéristique de ce mode. Les deux espèces actuelles de l'ordre des Rhynchocéphales semblent également présenter une TSD de type FM, bien que la possibilité là encore d'un déterminisme du type FMF n'ait pas été complètement éliminée (Cree *et al.*, 1995).

- mode Femelle-Mâle-Femelle (FMF) où les températures d'incubation extrêmes, basses et hautes, ne fournissent que des femelles et les températures intermédiaires des mâles.

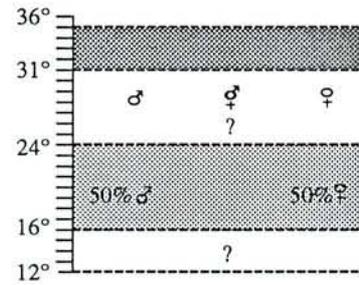
Ce dernier mode (FMF) serait le type de base à partir duquel les deux autres seraient apparus. Il se retrouve en effet dans les trois Ordres de Reptiles, Squamates, Chéloniens et Crocodiliens.

Amphibiens

Pleurodeles poireti



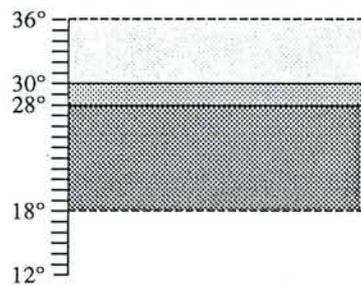
Pleurodeles walli



Reptiles

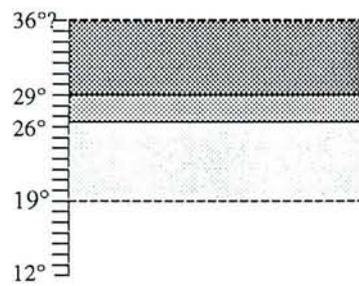
Pattern MF : Tortues

Ex : *Emys orbicularis*



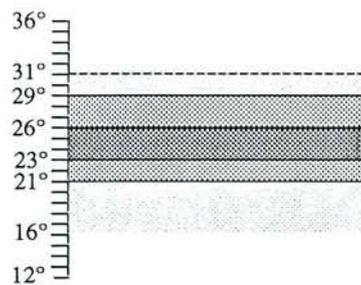
Pattern FM

Ex : *Agama agama*

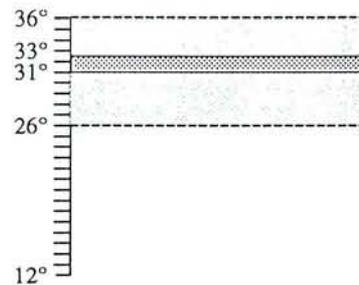


Pattern FMF : Lézards, Tortues, Crocodiliens

Ex : *Chelydra serpentina*

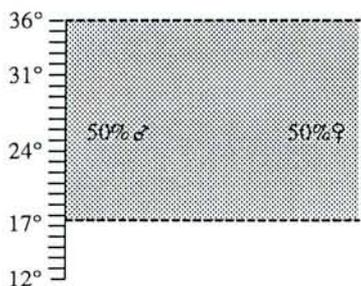


Ex : *Crocodylus johnstoni*



GSD : tous les Serpents, Tortues, Lézards

Ex : *Lacerta viridis*



Légende :

■ 100% ♂

▨ ♂ et ♀

□ 100% ♀

— limites déterminées

- - - limites non déterminées

Fig. 5 : Les différentes réponses de la détermination sexuelle à la température chez les Amphibiens et les Reptiles. (D'après Dournon *et al.*, 1990).

La détermination du sexe par la température semble être un caractère ancestral chez les crocodiliens ; elle a été décrite chez 11 des 22 espèces existantes et chez aucune espèce, des chromosomes sexuels n'ont été identifiés (Lang et Andrews, 1994). La constance de la TSD dans ce groupe contraste avec les autres groupes comme les tortues et les lézards où les modes de déterminisme du sexe sont très divers. L'universalité des mécanismes de la TSD semble ainsi prématurée : il existe sans doute des variations importantes entre les différentes espèces de reptiles.

Des caractères communs à l'action de la température peuvent être cependant distingués :

- existence d'une période thermosensible pendant laquelle la détermination du sexe est sensible à la température d'incubation de l'embryon.

- correspondance entre la période thermosensible et la période de différenciation sexuelle gonadique.

- effets quantitatifs de la température : la détermination sexuelle est sensible à la fois à la durée et l'amplitude de la température.

- la détermination reste labile aux changements de température aux stades précoces. Les changements dûs à la température sont réversibles à ces stades.

- pendant la période thermosensible, les effets de la température semblent être cumulatifs : plus un embryon est soumis longtemps à une température, plus la nouvelle température devra être extrême pour contrer les effets de la première.

- altération du sex ratio par les effets de stéroïdes exogènes appliqués pendant la période thermosensible.

3.3- Chez les Poissons.

Un effet de la température sur la différenciation sexuelle a été mis en évidence chez plusieurs espèces de Poissons. Ce phénomène a d'abord été décrit chez une espèce marine, *Menidia menidia* (Conover et Kynard, 1981), puis deux espèces tropicales d'eau douce, *Poeciliopsis lucida* (Sullivan et Schultz, 1986) et *Oreochromis niloticus* (Baroiller *et al.*, 1995) et une espèce côtière sud-américaine, l'atipa *Hoplosternum littorale* (Hostache *et al.*, 1995). L'augmentation de la température accroît le pourcentage des mâles

jusqu'à des valeurs proches de 100%. De plus, des effets génétiques interviennent sur la thermosensibilité des animaux : la détermination du sexe semble dépendre chez ces espèces de l'action conjuguée de la température et de facteurs génétiques. La détermination du sexe par la température chez les Poissons diffère de celle observée chez les Reptiles et les Amphibiens : chez les Poissons, le traitement thermique n'engendre pas d'intersexués, ni d'inversion complète de toutes les femelles.

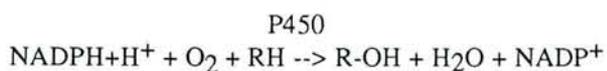
4- L'EFFET DES STÉROÏDES SEXUELS SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE.

De nombreux travaux ont montré l'intervention des stéroïdes sexuels sur la différenciation sexuelle des Vertébrés non-mammaliens. En effet, le traitement d'embryons ou de larves par des stéroïdes ou

des inhibiteurs de la synthèse des stéroïdes entraîne dans de nombreux cas des perturbations de la différenciation sexuelle pouvant aller jusqu'à l'inversion sexuelle complète.

4.1- La biosynthèse des stéroïdes sexuels. (Fig. 6)

Les stéroïdes sexuels sont synthétisés à partir du cholestérol fourni essentiellement par les lipoprotéines (LDL et HDL). De nombreuses enzymes de la stéroïdogenèse appartiennent au groupe des cytochromes P450 : ce sont des protéines d'environ 500 acides aminés contenant un groupement hème. Leur désignation P450 (Pigment 450) vient de leur absorbance caractéristique entre 420 et 450 nm. Les cytochromes P450 sont capables de réduire l'oxygène en relation avec un transporteur d'électrons :



Ces enzymes sont associées aux membranes, soit des mitochondries (P450 SCC) soit du reticulum endoplasmique (P450 17 α , P450 arom).

La coupure de la chaîne latérale du cholestérol par le cytochrome P450 SCC est la première étape, limitante et régulée par voie hormonale, de la stéroïdogenèse. La prégnénolone ainsi formée est ensuite convertie en androstènedione selon deux voies de synthèse grâce à la mise en jeu de deux enzymes, la cytochrome P450 17 α hydroxylase et la 3 β hydroxystéroïde déshydrogénase.

L'androstènedione est ensuite réduite en testostérone par le jeu de la 17 β hydroxystéroïde déshydrogénase. La testostérone peut être convertie par la 5 α réductase en un androgène plus puissant, la dihydrotestostérone.

Enfin, l'androstènedione et la testostérone servent de substrats à la production des oestrogènes. La cytochrome P450 aromase est l'enzyme qui convertit ces

androgènes (stéroïdes en C19) en oestrogènes, oestrone et oestradiol (stéroïdes en C18). Cette enzyme permet par une série d'hydroxylations

la perte du carbone 19 et l'aromatisation du cycle A des androgènes.

4.2- Effet des stéroïdes exogènes.

Il a été démontré que, chez de nombreuses espèces, la détermination du sexe est influencée par les stéroïdes :

- chez les Poissons (revue Hunter et Donaldson, 1983).

- chez les Amphibiens (revue Gallien, 1962).

- chez les Reptiles : l'implication des hormones dans la détermination sexuelle a été démontrée pour les trois Ordres de Reptiles (Raynaud et Pieau, 1985 ; Janzen et Paukstis, 1991 ; Crews *et al.*, 1994 ; Pieau *et al.*, 1994b ; Wibbels *et al.*, 1994).

Chez les Reptiles, l'influence des oestrogènes sur la détermination sexuelle a d'abord été démontrée par Pieau chez les tortues *Testudo graeca* et *Emys orbicularis* (Pieau, 1970, 1974), puis chez d'autres reptiles (Gutzke et Bull, 1986 ; Bull *et al.*, 1988 ; Lance et Bogart, 1992). Cet effet des oestrogènes existe aussi bien chez les espèces avec GSD que chez les espèces avec TSD. Ainsi, chez ces dernières, l'incubation des oeufs à une température masculinisante en présence d'oestrogènes aboutit à l'éclosion de femelles.

4.2.1- Effet des oestrogènes exogènes.

Chez les Poissons, l'application d'oestrone ou de stilbestrol (agoniste des oestrogènes) à des mâles d'*Oryzias latipes* provoque leur inversion fonctionnelle en femelles (Yamamoto, 1953).

De même, des traitements aux oestrogènes de larves d'Amphibiens entraînent l'inversion des mâles en femelles fonctionnelles chez *Xenopus laevis* (Witschi et Allison, 1950), *Pleurodeles waltl* (Gallien, 1954), *Ambystoma* (Burns, 1938 ; Foote, 1940), *Hynobius retardatus* (Hanaoka, 1941), *Triturus helveticus* et *T. alpestris* (Gallien et Collenot, 1960).

Chez les espèces avec TSD, la sensibilité aux oestrogènes est corrélée avec la sensibilité à la température. L'oestradiol contrecarre l'effet d'une température masculinisante et la période de sensibilité à l'oestradiol coïncide avec la période thermosensible (Crews *et al.*, 1989, 1991). De même, chez *Pleurodeles waltl*, l'oestradiol annule l'effet masculinisant des hautes températures d'élevage (Zaborski, 1986). Chez les espèces avec TSD, le traitement est d'autant plus efficace que l'on est proche de la température de transition, ce qui indique une synergie entre l'action des oestrogènes et celle de la température (Crews *et al.*, 1994).

Enfin, la féminisation produite par les oestrogènes est spécifique car les mêmes

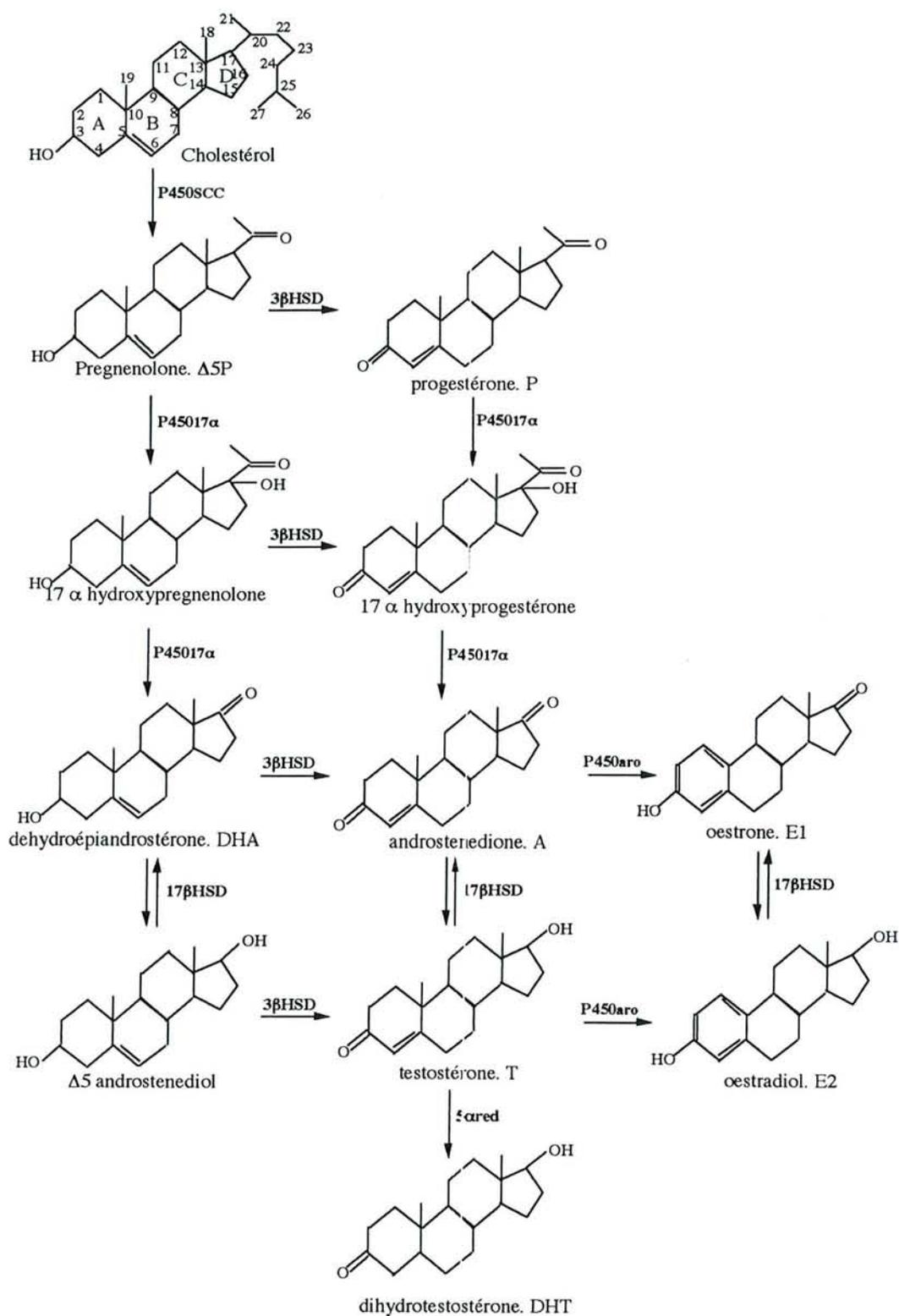


Fig. 6 : Les étapes de la stéroïdogénèse sexuelle.

d'après Miller (1988) et Waterman et Keeney (1992).

-P450scc : cholesterol side chain cleavage cytochrome P450

-3βHSD: 3β hydroxystéroïde déshydrogénase

-P45017α : 17α hydroxylase cytochrome P450 (17α hydroxylase, C17-->20 lyase)

-17βHSD : 17β hydroxystéroïde déshydrogénase

-P450aro : cytochrome P450 aromatasase

-5αred : 5α réductase

résultats sont obtenus avec des agonistes de l'oestradiol comme le diéthylstilboestrol chez les Reptiles (Crews *et al.*, 1989 ; Lance et Bogart, 1991 ; Wibbels et Crews, 1992) et chez le pleurodèle (Collenot, 1961).

Chez les Oiseaux, le traitement aux oestrogènes de mâles génétiques provoque une féminisation des gonades et le développement d'ovotestis, mais ceux-ci ne persistent pas à l'état adulte (Scheib, 1983).

Ainsi, chez des Vertébrés aussi bien avec TSD que GSD, les deux sexes présomptifs ont la capacité de répondre aux oestrogènes.

4.2.2- Effet des androgènes exogènes.

Il est également possible d'inverser le sexe des embryons femelles par des traitements à la testostérone.

Chez le poisson *Oryzias latipes*, l'inversion fonctionnelle de femelles génétiques XX a pu être obtenue par un traitement à la méthyltestostérone (Yamamoto, 1958). Chez la truite arc-en-ciel, la méthyltestostérone, ajoutée à l'alimentation, a également un effet masculinisant (Cousin *et al.*, 1989). Chez cette même espèce, la 11 β hydroxyandrostènedione semble aussi jouer un rôle important dans la masculinisation des gonades (Van den Hurk et Van Oordt, 1985).

De même, chez les Amphibiens, la testostérone est capable de masculiniser les femelles chez les Ranidae et les Hylidae (Gallien, 1962).

Chez les Reptiles, la testostérone appliquée à des embryons incubés à température féminisante n'a pas d'effet (Crews *et al.*, 1994). Au contraire, à température masculinisante, la testostérone a un effet paradoxal et conduit à l'éclosion de femelles du fait sans doute de sa conversion en oestradiol (Pieau, 1974 ; Gutzke et Bull, 1986 ; Crews *et al.*, 1989 ; Wibbels et Crews, 1992). Il n'existe jusqu'à présent, qu'une seule espèce de Reptile, le lézard *Calotes versicolor*, où la testostérone inverse les femelles ; chez cette espèce, l'oestradiol et la température n'ont pas d'effet sur la différenciation sexuelle (Ganesh et Raman, 1995).

4.2.3- Effet paradoxal des stéroïdes exogènes.

Chez les Amphibiens, il semble exister une relation entre la nature du sexe homogamétique et celle de l'hormone entraînant l'inversion sexuelle : pour le type XX/XY, la testostérone produit l'inversion des femelles XX ; pour le type ZZ/ZW, c'est l'oestradiol qui produit l'inversion des mâles ZZ : l'hormone du sexe hétérogamétique est capable d'inverser le sexe homogamétique.

Le traitement de larves d'Amphibiens par des hormones sexuelles à forte concentration peut aussi avoir des effets paradoxaux : effet masculinisant des oestrogènes et féminisant des androgènes. Là encore, il semble exister une liaison avec la nature du sexe homogamétique : chez les animaux ZZ/ZW, l'hormone mâle a un effet paradoxal (*Triturus*, *Ambystoma*, *Hynobius*,

Pleurodeles), tandis que chez les animaux XX/XY, c'est l'hormone femelle qui à forte

concentration devient masculinisante (Ranidae) (Gallien, 1962).

4.3- Métabolisme des stéroïdes sexuels dans les gonades au cours de la différenciation.

4.3.1- Contenu des gonades en stéroïdes.

In vivo, il existe des différences entre les sexes dans le contenu des gonades en stéroïdes. Chez *Emys orbicularis*, la quantité d'oestradiol dans les gonades est plus importante à température féminisante qu'à température masculinisante (Dorizzi *et al.*, 1991). La même différence est observée chez la tortue *Trachemys scripta* dans les complexes surrénale-rein-gonade (White et Thomas, 1992).

A l'inverse, il existe dans les testicules embryonnaires d'*Emys orbicularis* de plus grandes quantités d'androstènedione, de dihydrotestostérone et d'oestrone que dans les ovaires (Pieau *et al.*, 1982).

4.3.2- Activité de la 3 β HSD.

Des différences dans les activités des enzymes de la stéroïdogénèse entre les deux sexes ont aussi pu être mises en évidence.

Les premiers travaux, réalisés sur *Emys orbicularis*, montrent que l'activité de la 3 β HSD est plus importante à température masculinisante qu'à température féminisante (Pieau, 1973). De même, Joss (1989) a

montré chez l'alligator la présence de cette même enzyme dans les testicules embryonnaires mais pas dans les ovaires. En revanche, la 3 β HSD a été détectée dans les surrénales mais pas dans les gonades embryonnaires chez *Lepidochelys olivacea* (Merchant-Larios *et al.*, 1989), *Trachemys scripta* (Thomas *et al.*, 1992) et *Crocodylus porosus* (Smith et Joss, 1994).

⇒ dans ces deux espèces.

Chez le pleurodèle, la 3 β HSD est présente dans les deux sexes dès le stade 44 dans les gonades indifférenciées, soit peu de temps après le début de la période thermosensible (Collenot, 1965 ; Collenot et Collenot, 1977).

4.3.3- Action du tamoxifène.

Les traitements d'embryons par des antioestrogènes tels que le tamoxifène ont donné des résultats variables selon les espèces.

Chez les Reptiles avec TSD, un effet masculinisant du tamoxifène a été observé sur des embryons incubés à température féminisante chez *Emys orbicularis* (Dorizzi *et al.*, 1991). En revanche, le tamoxifène a une

action oestrogénique à température masculinisante mais pas d'effets à température féminisante chez *Alligator mississippiensis* et *Trachemys scripta* (Lance et Bogart, 1991 ; Wibbels et Crews, 1992).

Chez les Oiseaux, le tamoxifène annule l'action féminisante des androgènes et de l'oestradiol sur les embryons mâles de poulet (Weniger *et al.*, 1981) et peut masculiniser des gonades d'embryons femelles (Scheib, 1983 ; Weniger, 1991).

4.3.4- Activité de l'aromatase.

Ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur la dernière étape de la synthèse des oestrogènes, l'aromatase, et sur le rôle de cette enzyme dans la détermination sexuelle.

Chez les tortues *Emys orbicularis* et *Dermochelys coriacea*, l'activité aromatase est corrélée avec la différenciation ovarienne (Desvages et Pieau, 1992a ; Desvages *et al.*, 1993). Ainsi, il existe une plus forte activité aromatase dans les ovaires présomptifs que dans les testicules présomptifs et cette activité coïncide avec un contenu des gonades plus élevé en oestrogènes (Desvages et Pieau, 1991).

De plus, l'augmentation de l'activité aromatase dans les ovaires concorde avec la fin de la période thermosensible ; pendant cette période, le changement de la température d'incubation des oeufs, d'une température masculinisante à une température féminisante,

provoque une augmentation de l'activité aromatase, et inversement (Desvages et Pieau, 1992b).

De même, chez l'alligator, l'activité aromatase dans les gonades est faible à 33°C, température à laquelle on obtient uniquement des mâles, et forte à 30°C où l'on obtient uniquement des femelles (Smith *et al.*, 1995). Des résultats similaires ont été obtenus chez *Crocodylus porosus* (Smith et Joss, 1994a). L'augmentation de l'activité aromatase accompagne la différenciation morphologique de l'ovaire mais chez ces crocodiliens, contrairement à *Emys orbicularis*, l'activité aromatase est faible et ne semble pas être affectée par la température pendant la période thermosensible : il n'y a pas de différence entre les ovaires et les testicules présomptifs jusqu'après la période thermosensible, après que le sexe ait commencé à se différencier (Smith *et al.*, 1995).

De même, chez la truite arc-en-ciel, l'activité aromatase n'est détectée que dans les ovaires déjà différenciés (Van den Hurk *et al.*, 1982). Chez *Oreochromis niloticus*, l'activité aromatase n'est détectée qu'une à deux semaines après l'apparition des premiers critères de la différenciation ovarienne (Baroiller, 1988).

4.3.5- Action des inhibiteurs d'aromatase.

Les traitements d'embryons femelles avec des inhibiteurs d'aromatase ont entraîné des degrés divers de masculinisation dans

toutes les classes de Vertébrés hormis chez les Mammifères.

Chez le saumon *Oncorhynchus tshawytscha*, un traitement de deux heures au fadrozole d'alevins femelles, peu après l'éclosion, entraîne le développement de 23% de mâles fertiles (Piferrer *et al.*, 1994).

Chez *Rana catesbeiana*, le traitement de têtards femelles avec la 4-hydroxy-androstènedione provoque une diminution de la sécrétion d'oestradiol et une augmentation de la sécrétion de testostérone et, par suite, la transformation d'ovaires en testicules (Yu *et al.*, 1993).

Chez les Reptiles, les inhibiteurs d'aromatase ont des effets très variables selon les espèces. Chez la tortue *Malaclemys terrapin* et chez *Alligator mississippiensis*, le fadrozole a un faible effet sur la différenciation ovarienne

(Jeyasuria *et al.*, 1994 ; Lance et Bogart, 1992). En revanche, chez *Chelydra serpentina*, *Trachemys scripta* et *Emys orbicularis*, le même inhibiteur provoque le développement de structures testiculaires chez des individus d'une ponte incubée à température féminisante (Rhen et Lang, 1994 ; Wibbels et Crews, 1994 Dorizzi *et al.*, 1994). Des inversions ont aussi été obtenues chez le lézard *Cnemidophorus uniparens*, une espèce unisexuée avec uniquement des femelles parthénogénétiques triploïdes (Wibbels et Crews, 1994).

Enfin, les inhibiteurs de l'aromatase induisent aussi des inversions sexuelles chez les Oiseaux : chez le poulet, 50% des embryons traités par le fadrozole se sont développés en mâles permanents, mais ces animaux étaient stériles (Elbrecht et Smith, 1992).

4.4- Rôle des stéroïdes dans la détermination sexuelle.

Tous ces travaux ont conduit à l'élaboration de différents modèles de déterminisme du sexe chez les reptiles avec TSD.

Dans le modèle suggéré par Claude Pieau, la température altérerait l'environnement stéroïdien de l'embryon en agissant sur l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse, notamment l'aromatase, et des récepteurs aux hormones (Pieau *et al.*, 1994a, b). Ainsi, la production d'oestrogènes par l'aromatase dépendrait de la température, et les concentrations des stéroïdes dans les gonades

sont différentes selon les températures d'incubation.

Bogart (1987) a proposé que le rapport des stéroïdes était le phénomène déterminant chez les espèces avec TSD mais aussi chez les autres Vertébrés, un rapport androgènes/oestrogènes faible permettant un développement ovarien et inversement.

Dans de tels modèles, la production d'oestradiol joue un rôle central, ce qui a été démontré en particulier chez les Reptiles

| | Poissons | Amphibiens | | Reptiles | | | Oiseaux |
|---------------------------------|----------|------------|-------|----------|---------|-----------|---------|
| | | XX/XY | ZZ/ZW | GSD | TSD | | |
| | | | | | T° masc | T° interm | T° fém |
| Stéroïdes | | | | | | | |
| Androgènes | | | | | | | |
| Testostérone | ♂ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♀ | - |
| DHT | | | | | - | ♂ | - |
| Oestrogènes | ♀ | ♂ | ♀ | ♀ | ♀ | ♀ | - |
| Ligands synthétiques | | | | | | | |
| Diéthylstilboestrol | ♀ | | ♀ | | ♀ | | |
| Tamoxifène | | | | | ♀ | ♀ | I |
| Inhibiteurs enzymatiques | | | | | | | |
| Inhibiteurs aromatase | ♂ | ♂ | | ♂ | - | ♂ | ♂ |
| Inhibiteurs réductase | | | | | - | ♀ | - |
| Inhibiteurs 3βHSD | | ♂ | | | - | | - |

Fig. 7 : Tableau simplifié des différents traitements hormonaux et chimiques réalisés chez les Vertébrés.

- ♂ Masculinisation
- ♂ Masculinisation fonctionnelle
- Pas d'effet
- ♀ Féminisation
- ♀ Féminisation fonctionnelle
- I Intersexués

(Wibbels et Crews, 1994 ; Crews *et al.*, 1994) :

- des traitements à l'oestradiol provoquent une différenciation sexuelle femelle .

- l'action des oestrogènes est similaire à celle de la température chez les espèces avec TSD.

- les stéroïdes et les enzymes de la stéroïdogénèse sont présents pendant la période de différenciation sexuelle de la gonade.

- il existe une plus forte activité aromatasase et une plus grande quantité d'oestrogènes dans les gonades à température féminisante chez les espèces avec TSD.

- la différenciation ovarienne est interrompue par des inhibiteurs de l'aromatase.

Wibbels et Crews (1994) ont proposé un rôle de pivot pour la testostérone, métabolisée en oestradiol ou en dihydrotestostérone. Dans cette optique, la 5 α réductase jouerait un rôle similaire à celui de l'aromatase. La dihydrotestostérone, qui n'est pas aromatisable, engendre chez la tortue *Trachemys scripta* le développement

préférentiel de mâles à température d'incubation intermédiaire (Wibbels et Crews, 1993) ; une application simultanée d'oestradiol et de dihydrotestostérone à cette même température engendre des intersexués. Enfin, des inhibiteurs de réductase, administrés à cette même température, augmentent le pourcentage de femelles (Crews et Bergeron, 1994).

Ainsi, des Poissons aux Oiseaux, le métabolisme des stéroïdes sexuels joue un rôle primordial dans la différenciation gonadique, aussi bien chez les espèces avec TSD qu'avec GSD. Dans les quatre classes de Vertébrés, Poissons, Amphibiens, Reptiles et Oiseaux, des inversions sexuelles complètes ont pu être obtenues par des traitements avec des inhibiteurs d'aromatase.

L'aromatase aurait comme rôle la production d'oestrogènes mais aussi l'élimination des androgènes, promouvant ainsi la différenciation ovarienne et inhibant à la fois la différenciation testiculaire.

Néanmoins, chez certaines espèces, les inhibiteurs d'aromatase n'ont pas entraîné d'inversion, la différenciation mâle nécessitant sans doute la mise en jeu d'autres facteurs.

L'objectif de ce travail était l'étude de la détermination et de la différenciation sexuelle chez *Pleurodeles waltl*. Cette espèce représente un modèle d'étude intéressant de la différenciation sexuelle, car elle présente à la fois un déterminisme génétique du sexe comme la plupart des Vertébrés, et une sensibilité de la différenciation sexuelle à la température dont les mécanismes pourraient être très proches de ceux du déterminisme du sexe par la température chez les Reptiles.

Ce travail avait pour but, dans un premier temps, la recherche de séquences Sox intervenant dans la différenciation sexuelle

chez le pleurodèle. Cette étude a abouti à l'identification d'un domaine Sox, PwSox1.

Dans un deuxième temps, les travaux ont porté sur la recherche de la cible de la température au cours de la différenciation sexuelle. Comme l'oestradiol inhibe l'action de la température chez le pleurodèle et que les relations entre température et stéroïdes sexuels sont bien démontrées chez les Reptiles, nous avons étudié la régulation de l'activité de l'aromatase au cours de la différenciation sexuelle ainsi que les effets de divers traitements chimiques et hormonaux sur la différenciation sexuelle.

MATERIEL ET METHODES

1- Elevage des animaux.

Les pleurodèles sont élevés au laboratoire dans l'eau courante à $18 \pm 2^\circ\text{C}$. A cette température, la période embryonnaire dure 2 semaines et la métamorphose survient à environ 4 mois, la maturité sexuelle est atteinte entre 12 et 18 mois (Fig. 4).

Les animaux sont nourris peu après l'éclosion avec des artémies puis à partir du stade 51-52 avec des larves de chironomes et après la métamorphose avec du coeur de boeuf haché.

Pour toute opération, les animaux sont anesthésiés dans une solution à 3% de benzocaïne (éthyl p-amino benzoate) dans l'éthanol diluée à 1% dans l'eau du robinet.

2- Détermination du génotype sexuel.

Chez le pleurodèle, les chromosomes sexuels mitotiques ne présentent pas d'hétéromorphisme. Cependant, au niveau des boucles de transcription des chromosomes méiotiques d'ovocyte (chromosomes en écouvillon) il existe une zone hétéromorphe entre les chromosomes Z et W (Lacroix *et al.*, 1990).

Le génotype sexuel peut être déterminé grâce à la présence d'une enzyme dimérique liée au sexe, la peptidase 1 (Ferrier *et al.*, 1980 ; Dournon *et al.*, 1988). Cette enzyme, spécifique de la liaison valyl-leucine *in vitro*, présente une forme A liée au chromosome Z et une forme B ou β , suivant l'origine nord-africaine ou ibérique des animaux (Rudolf *et al.*, 1996).

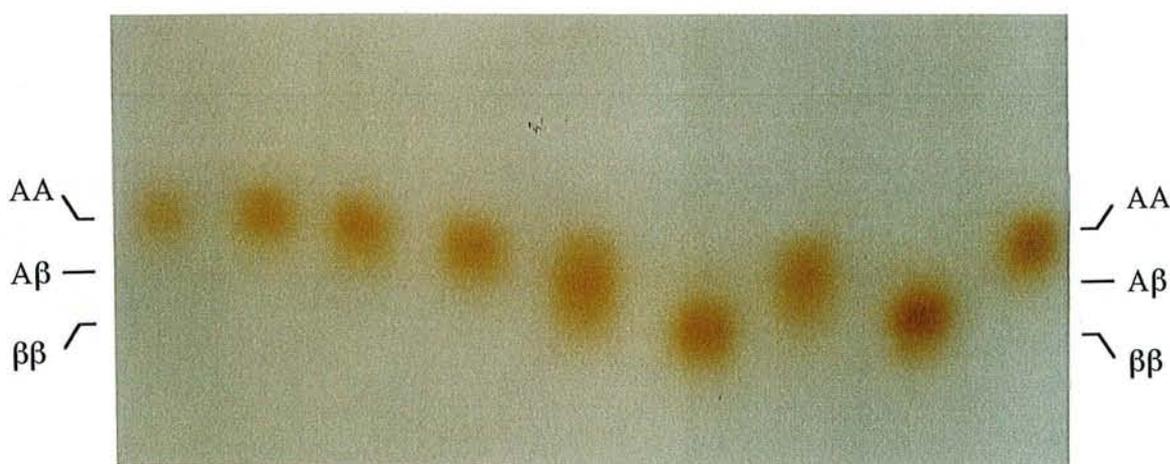


Fig. 8 : Patrons électrophorétiques de la peptidase 1 de larves issues d'un croisement entre un thermoneomale $Z_A W_\beta$ et une femelle $Z_A W_\beta$.

Pistes 1, 2, 3, 4 et 9 : Mâle $Z_A Z_A$; pistes 5 et 7 : femelle $Z_A W_\beta$; pistes 6 et 8 : femelle $W_\beta W_\beta$.

Les animaux de génotype mâle sont donc $Z_A Z_A$ et ceux de génotype femelle $Z_A W_B$ ou $Z_A W_\beta$. Les différents dimères enzymatiques peuvent être visualisés après séparation par électrophorèse en gel d'amidon (Fig. 8).

Le test de sexage est réalisé sur des prélèvements sanguins chez l'adulte et sur des morceaux de queue chez les larves : ce test est réalisable à partir du stade 42 environ et ne nécessite pas le sacrifice des animaux.

L'extrémité de la queue est prélevée et broyée dans un tampon Tris- HCl 50 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, NaCl 25 mM. Les échantillons migrent 5h30 dans un gel d'amidon à 12% (stacking à 9%). Après migration, l'activité peptidase est révélée par l'hydrolyse d'un substrat valyl-leucine couplée avec une réaction colorée à la peroxydase.

3- Traitement par la température d'élevage.

Pour l'inversion par la température, des larves d'une même ponte sont élevées dans de l'eau à 32°C du stade 42 au stade 55 (Fig. 9). Dans ces conditions, les larves de génotype femelle ZW se différencient toutes en mâles fonctionnels. Ce traitement thermique ne perturbe pas la différenciation des larves ZZ en mâles.

Les néomâles ZW croisés avec des femelles standard ZW donnent dans la descendance 1/4 d'individus WW qui se développent en femelles. Ces dernières ne se

différencient des autres femelles que par leur génotype sexuel.

4- Traitements hormonaux et chimiques.

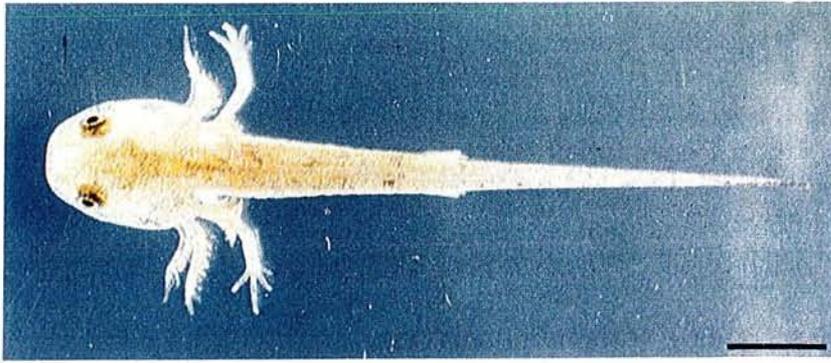
Le génotype sexuel des larves a été déterminé par le test de la peptidase-1 avant tout traitement (traitements à l'oestradiol, au tamoxifène, au miconazole, à l'aminogluthetimide) ou après le traitement chimique (traitements au fadrozole et à la dihydrotestostérone).

Sauf pour les tests des inhibiteurs d'aromatase, les animaux ont été traités à raison de 15 à 20 larves pour 2 litres d'eau. La concentration en hormones ou en inhibiteurs a été ajustée dans l'eau d'élevage à partir d'une solution mère à 5 mg/ml dans l'éthanol absolu. Les larves ont été nourries et l'eau d'élevage renouvelée 3 fois par semaine. Tous les traitements réalisés sont donnés dans le tableau 1.

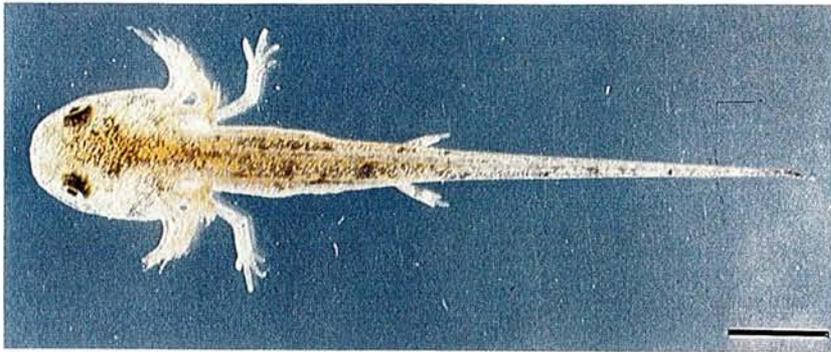
5- Histologie.

Après les différents traitements, la structure histologique des gonades a été examinée pour vérifier l'effet du traitement sur la différenciation sexuelle.

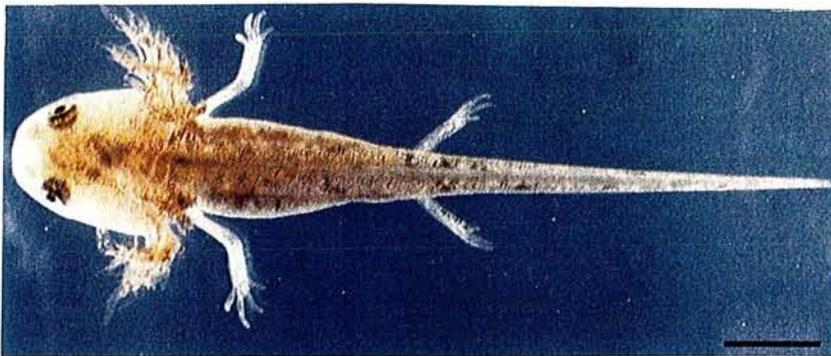
Après prélèvement, les gonades ont été fixées au liquide de Bouin puis incluses dans la paraffine et sectionnées à 7µm d'épaisseur. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline éosine.



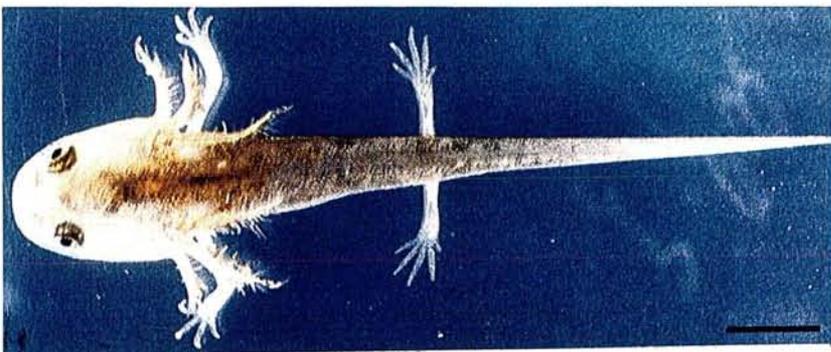
Stade 48
Barre=1,9mm



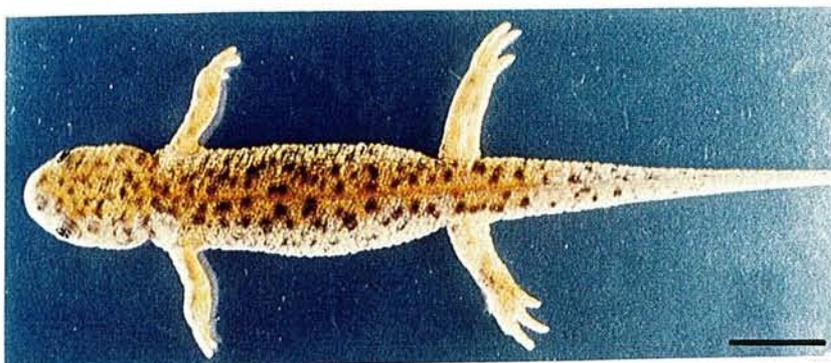
Stade 50
Barre=2,2mm



Stade 52
Barre=3mm



Stade 54
Barre=3,6mm



Stade 56
Barre=8,5mm

Fig. 9 : Illustrations de différents stades de développement du pleurodèle

EFFETS D'INHIBITEURS SUR L'ACTIVITÉ AROMATASE

L'inhibiteur a été ajouté dans l'eau d'élevage de larves femelles et l'activité aromatase a été mesurée 2 jours après.

| <i>Inhibiteur</i> | <i>Concentration testée</i> | <i>Larves : génotype sexuel et stade du traitement</i> |
|--------------------------------------|-----------------------------|--|
| Aminogluthetimide (Sigma) | 2 mg/l | femelles ZW stade 53 |
| | 5 mg/l | |
| | 7 mg/l | |
| Nitrate de miconazole (Sigma) | 1 mg/l | femelles ZW stade 53 |
| | 0,5 mg/l | |
| Fadrozole (CGS16949) (Ciba-Geigy) | 0,4 mg/l | femelles ZW stade 53 |
| | | femelles WW stade 53 |

EFFETS D'INHIBITEURS SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

| <i>Inhibiteur</i> | <i>Concentration</i> | <i>Génotype sexuel</i> | <i>Période du traitement</i> |
|-----------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Miconazole | 250 µg/l | ZW | st. 52 --> fin st. 55 |
| Fadrozole | 100 µg/l | ZZ et ZW (ponte standard) | st. 52 --> fin st. 55 |
| | 400 µg/l | ZZ, ZW et WW (ponte ZWxZW) | st. 52 --> fin st. 55 |
| Tamoxifène (Sigma) | 100 µg/l | ZZ | st. 52 --> fin st. 55 |
| | | ZW | st. 52 --> fin st. 55 |

EFFETS DES HORMONES SUR LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

| <i>Hormone</i> | <i>Concentration</i> | <i>Génotype sexuel</i> | <i>Période du traitement</i> |
|--|----------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Benzoate d'oestradiol (Sigma) | 100 µg/l | ZZ | st. 52 --> fin st. 55 |
| | | ZZ | st. 52 --> fin st. 55 |
| | | ZW | st. 52 --> fin st. 55 |
| Benzoate de dihydrotestostérone(Sigma) | 600 µg/l | ZZ, ZW et WW (ponte ZWxZW) | st. 52 --> fin st. 55 |

Tableau 1 : Traitements chimiques et hormonaux réalisés chez le pleurodèle.

6- Dosage de l'activité aromatasase.

L'activité aromatasase a été déterminée par la méthode décrite par Ackerman *et al.* (1981). Après dissection, les gonades sont rapidement rincées dans du milieu RPMI 1640, puis incubées pendant 4h30 à 37°C dans du milieu RPMI contenant 0,5 µM de [1β - ^3H] androstènedione (activité spécifique 21,5 ou 24,5 Ci/mmol suivant les différents lots, New England Nuclear). Après l'incubation, les stéroïdes sont extraits par extraction au chloroforme et adsorption sur charbon actif. L'aromatation de l'androstènedione marquée provoque la production d'eau tritiée. La radioactivité ainsi libérée dans le milieu est mesurée au compteur à scintillation. L'activité aromatasase est calculée à partir de cette mesure et est exprimée en femtomoles par gonade et par heure.

L'activité aromatasase a été mesurée du stade 47 au stade 56. Pour des raisons pratiques de dissection, les mesures ont été réalisées du stade 47 au stade 52 sur l'ensemble "gonades et mésonéphros". A partir du stade 53, le prélèvement des gonades seules est possible et les dosages ont alors été réalisés sur les gonades seules.

Comme témoins, l'activité aromatasase a été mesurée dans les mésonéphros sans gonades et dans les corps gras de larves au stade 54. Les corps gras, longitudinaux, bordent les gonades. Leur origine est commune avec celle des gonades.

Pour tous les dosages, une température unique, différente des températures d'élevage a été choisie. La température de 37°C a été choisie après des dosages réalisés à différentes températures : des dosages ont été effectués à 20, 32 et 37°C sur les ovaires de six femelles ZW au stade 55. Pour chacune de ces femelles, la gonade droite a été incubée à une température et la gonade gauche à une autre température, de façon à comparer l'action de la température sur l'activité aromatasase lors du dosage. Les résultats montrent que les activités aromatasase sont légèrement plus fortes à 32 qu'à 37°C, et ces activités sont environ deux fois plus fortes qu'à 20°C (Tableau 2).

7- Analyse statistique.

Pour l'analyse statistique, les valeurs de l'activité aromatasase ont été transformées en logarithme pour égaliser les variances trop différentes entre les mâles et les femelles. Les analyses ont été réalisées séparément pour chaque stade. Les activités aromatasase pour chaque stade ont été comparées par l'analyse de variance (ANOVA). Quand un effet significatif global est obtenu, le test t multiple protégé est ensuite utilisé pour comparer deux à deux les différents traitements réalisés pour un même stade larvaire. Les différences sont considérées comme significatives pour $P < 0,05$.

| Larves | Gonades | Température | Activité aromatase fmol/gonade/heure |
|--------|---------|-------------|---|
| 1 | OG | 20 | 302 |
| | OD | 37 | 570 |
| 2 | OG | 20 | 786 |
| | OD | 37 | 1083 |
| 3 | OG | 20 | 537 |
| | OD | 32 | 1244 |
| 4 | OG | 20 | 793 |
| | OD | 32 | 1134 |
| 5 | OG | 32 | 739 |
| | OD | 37 | 553 |
| 6 | OG | 32 | 1385 |
| | OD | 37 | 1167 |

Tableau 2 : Effets de la température d'incubation lors du dosage sur l'activité aromatase.

OD : ovaire droit, OG : ovaire gauche de larves femelles ZW au stade 55.

8- Isolement de la séquence *PwSox1*.

L'isolement de *PwSox1* a été réalisé en collaboration avec Philippe Berta du Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire à Montpellier (CNRS UPR 9008).

Un échantillon d'ADN de pleurodèle mâle a été amplifié par PCR en utilisant des amorces dégénérées ciblées sur les extrémités du domaine HMG de SRY (Griffiths, 1991) :

5'AAGCGACCCATGAA(C/T)GCNTT
5'GTA(TT)(G/A)TA(G/A)T(C/T)NGG(A/G)TA

Les produits de PCR ont été sous-clonés au niveau du site *SmaI* du plasmide pBluescript SK, et un clone, *PwSox1* a été séquencé.

9- Southern blot.

Des échantillons d'ADN génomique de pleurodèle, d'axolotl, de triton palmé et de xénope ont été digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII*. Les digestions ont été séparées par électrophorèse sur gel d'agarose (0,75%) et transférées sur membrane de nylon Hybond N (Amersham).

La membrane est ensuite préhybridée pendant 4 heures dans du milieu Hybond (NaCl 750 mM, héparine 50 ng/ml, SDS 1%, sulfate de dextran 5%, ADN de saumon 50 µg/ml) puis hybridée toute la nuit dans le même milieu contenant la sonde dénaturée. La sonde est marquée par incorporation de $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP par la technique de random priming

(Boehringer). La membrane est ensuite lavée 15 minutes dans du 2xSSC (1xSSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium pH 7,0) à 65°C puis 30 minutes dans du 2xSSC, 0,1% SDS à 65°C. La membrane a été ensuite exposée 14 jours sur des films Hyperfilm MP (Amersham).

10- Hybridation in situ sur chromosomes en écouvillon.

Cette hybridation a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Nicole Angelier (Université Paris VI) durant un stage à Paris.

Les ovocytes d'Amphibiens ont la particularité de présenter, au stade diplotène, des chromosomes en écouvillon, particulièrement développés chez le pleurodèle. Ces chromosomes présentent le long de leur axe des boucles d'ADN décondensé correspondant à des séquences en cours de transcription.

Les chromosomes en écouvillon ont été préparés suivant la technique de Gall (1954). Un fragment d'ovaire est prélevé sur une femelle anesthésiée. Après dissociation du stroma ovarien, les gros ovocytes sont énucléés dans une solution de KCl 75 mM,

NaCl 25 mM, MgCl₂ 10mM, CaCl₂ 10 mM, HEPES 10 mM pH 7,2. Le noyau de l'ovocyte est prélevé à l'aide d'une micropipette et placé sur une lame de verre épaisse, pourvue d'une chambre circulaire. L'enveloppe nucléaire est déchirée manuellement puis éliminée à l'aide d'une pince fine et d'une micro-aiguille. Le contenu nucléaire qui s'étale sur le fond de la chambre est centrifugé pendant 30 minutes à 1500xg de manière à fixer les chromosomes sur la lame. Les préparations chromosomiques sont ensuite fixées dans l'éthanol 70° pendant 30 minutes.

Les deux sondes ARN sens et anti-sens de PwSox1 ont été hybridées en parallèle sur ces préparations. Chaque sonde est dénaturée pendant 10 minutes à 85°C puis à 0°C. Les sondes sont ensuite reprises dans le milieu d'hybridation suivant : sonde ARN (4.10⁵ cpm/lame), 4xSSC, Na₃PO₄ 0,1 M, ARNt d'*E. coli* et de levure 300 µg/ml, DTT 100mM, formamide 40%. L'hybridation est réalisée pendant une nuit à 42°C en chambre humide (4xSSC, formamide 40%). les lames sont ensuite lavées pendant une heure à 65°C dans du 1xSSC, puis recouvertes d'émulsion (NTB2 Kodak).

Après 13 jours d'exposition, les lames sont révélées et les chromosomes sont colorés au bleu de Coomassie.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE : RECHERCHE DE SEQUENCES SOX CHEZ LE PLEURODELE.

1- Isolement d'une séquence Sox chez le pleurodèle.

En collaboration avec l'équipe de Philippe Berta à Montpellier, nous avons amplifié par PCR chez le pleurodèle mâle, une séquence homologue au domaine HMG du gène SRY, partie du gène la plus conservée et codant le site de fixation de la protéine sur l'ADN. La séquence ainsi amplifiée a été

clonée puis séquencée : c'est un fragment d'ADN de 216 paires de bases pour lequel la protéine déduite présente 54% d'acides aminés conservés avec le domaine HMG de SRY (Fig. 10). Par convention, cette séquence a été nommée PwSox1 (*Pleurodeles waltl* Sox1).

```

SRY-box : ATC GTG TGG TCT CGC GAT CAG AGG CGC AAG ATG GCT CTA GAG
PwSox1 : ATG GTC TGG TCC CGC GGC CAG AGA CGG AAA ATG GCA CAG GAG
PwSox1 :  M  V  W  S  R  G  Q  R  R  K  M  A  Q  E

AAT CCC AGA ATG CGA AAC TCA GAG ATC AGC AAG CAG CTG GGA TAC
AAC CCC AAA ATG CAC AAC TCG GAG ATC AGC AAG CCC CTA GGC GCA
N  P  K  M  H  N  S  E  I  S  K  P  L  G  A

CAG TGG AAA ATG CTT ACT GAA GCC GAA AAA TGG CCA TTC TTC CAG GAG
GAC TGG AAG CTG CTG AGC GAC GCT GAG AAG CGG CCC TTC ATA GAC GAG
D  W  K  L  L  S  D  A  E  K  R  P  F  I  D  E

GCA CAG AAA TTA CAG GCC ATG CAC AGA GAG AAA
GCC AAG CGT CTG CGT GCC GTT CAC ATG AAG GAT
A  K  R  L  R  A  V  H  M  K  D

```

Fig. 10 : Séquences du domaine SRY-box et de PwSox1.

Les lettres en gras indiquent les nucléotides et les acides aminés conservés entre l'homme et le pleurodèle.

2- Conservation de *PwSox1*.

| | | | | | | | |
|-----------|---------------|------------|------------|------------|---------------|------------|---------|
| | <i>PwSox1</i> | MVWSRGQRRK | MAQENPKMHN | SEISKPLGAD | WKLLSDAEKR | PFIDEAKRLR | AVHMKD |
| Homme | <i>SOX3</i> | ----- | ----- | ----- | -----T----- | ----- | -----E |
| Souris | <i>Sox3</i> | ----- | ----- | ----- | -----T----- | ----- | -----E |
| Marsupial | <i>SmSox3</i> | ----- | ----- | ----- | -----T----- | ----- | -----E |
| Poulet | <i>CSox3</i> | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | -----E |
| Mouette | <i>SoxLf3</i> | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | -----E |
| Xénope | <i>XSox11</i> | ----- | ----- | ----- | -----S----- | ----- | -----E |
| Souris | <i>Sox1</i> | ----- | ----- | -----E | -----VME----- | ----- | -----LE |
| Souris | <i>Sox2</i> | ----- | ----- | ----- | -----ET----- | ----- | -----LE |

Fig. 11 : Séquences en acides aminés de *PwSox1* et des domaines Sox les plus proches.

PwSox1 est très proche de plusieurs autres domaines Sox : elle présente près de 98% d'acides aminés conservés avec Sox3 des Mammifères et des Oiseaux (Fig. 11). Chez les Anamniotes, la séquence la plus proche de *PwSox1* est XSox11 du xénope.

L'hybridation de *PwSox1* sur southern blot montre en effet la présence de séquences

homologues chez d'autres espèces d'Amphibiens comme le triton palmé et le xénope (Fig. 12). Chez le pleurodèle, *PwSox1* ne semble pas lié au sexe : en effet, on observe sur l'ADN digéré par *HindIII* une bande de 2 Kb présente chez le mâle comme chez la femelle. Afin de confirmer la localisation autosomique de *PwSox1*, une hybridation sur chromosomes en écouvillon a été réalisée.

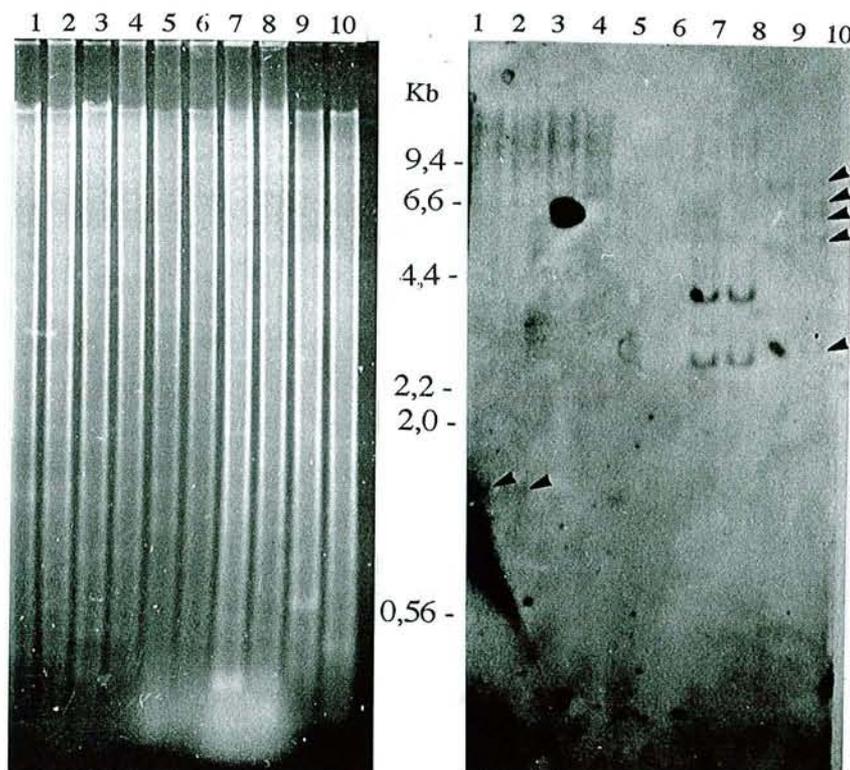


Fig. 12 : A : Electrophorèse en gel d'agarose d'ADN d'Amphibiens. L'ADN a été digéré par *HindIII* (pistes 1, 2, 6, 8 et 10) et par *EcoRI* (pistes 3, 4, 5, 7 et 9). Pistes 1 et 3 : pleurodèle femelle ZW ; 2 et 4 : pleurodèle mâle ZZ ; 5 et 6 : axolotl ; 7 et 8 : triton palmé ; 9 et 10 : xénope. B : Hybridation avec *PwSox1*.

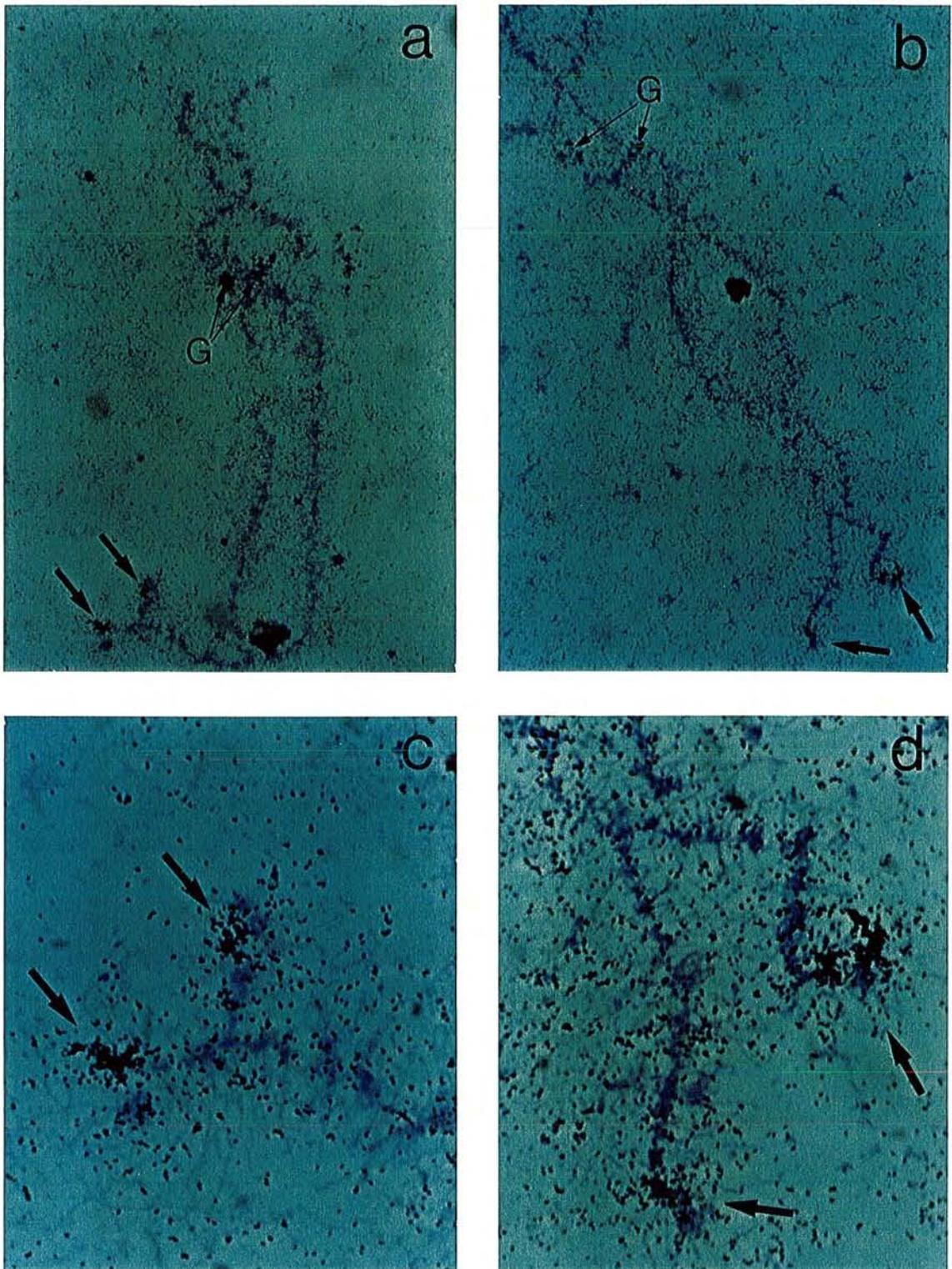


Fig. 13 : Hybridation *in situ* sur chromosomes en écouvillon.

PwSox1 s'hybride sur l'extrémité de l'autosome VI (flèches) caractérisé par la présence de boucles globulaires (G). a et b : Gx340 ; c et d : Gx1060.

3- Hybridation sur chromosomes en écouvillon.

L'hybridation ARN-ARN *in situ* sur chromosomes en écouvillon d'ovocytes est une technique sensible car la sonde ARN s'hybride sur les multiples copies d'ARN en cours de synthèse à l'endroit d'une boucle d'ADN décondensé. En revanche, cette

technique ne permet de localiser que les séquences transcrites à ce stade dans l'ovocyte.

L'hybridation de la sonde ARN "sens" ne montre aucun signal d'hybridation spécifique tandis que l'ARN "antisens" s'hybride sur l'extrémité du bras court du chromosome VI (Fig 13).

Conclusion.

La recherche de gènes Sox chez le pleurodèle a abouti à l'isolement du domaine PwSox1. L'hybridation de PwSox1 sur southern blot montre la présence de séquences apparentées chez d'autres Amphibiens.

Au vu de sa séquence protéique, PwSox1 pourrait être l'homologue du gène Sox3. Chez les Mammifères et les Oiseaux, ce gène intervient dans le développement du système nerveux comme le montrent ses profils d'expression chez le poulet (Uwanogho *et al.*, 1995), la souris et l'homme (Stevanovic *et al.*, 1993).

PwSox1 est localisé sur l'autosome VI et est transcrit dans l'ovocyte à la fin de l'ovogenèse. Néanmoins, la faible stringence utilisée pour l'hybridation *in situ* (lavages dans 1xSSC) ne permet pas d'affirmer que le signal observé ne correspond pas à un autre gène Sox proche de PwSox1. De même, le grand

nombre de séquences transcrites le long des chromosomes en écouvillon (y compris des séquences non codantes) ne permet pas non plus d'affirmer que PwSox1 intervient dans l'ovogenèse ou dans le développement précoce. Des hybridations sur northern blot permettront de préciser l'expression de ce gène et de vérifier si l'ARN transcrit dans l'ovocyte est effectivement stocké. De telles études devront être effectuées en utilisant comme sondes des portions du gène extérieures au domaine Sox afin d'éviter les hybridations croisées avec d'autres gènes Sox. L'étude de l'expression de PwSox1 nécessite donc le clonage de l'ADNc entier. Un criblage par PCR de banques d'ADNc d'ovaire et d'embryon au stade bourgeon caudal a révélé la présence de domaines Sox dans ces deux tissus mais l'isolement du (ou des) ADNc n'a pu être mené à terme.

DEUXIEME PARTIE : ACTIVITE DE L'AROMATASE ET ACTION DES HORMONES SEXUELLES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION SEXUELLE.

1- Activité aromatasé au cours de la différenciation sexuelle.

L'activité aromatasé a été mesurée dans les gonades au cours de la différenciation sexuelle de larves ZZ, ZW et WW élevées à température ambiante (Fig. 14). Les dosages

ont été réalisés sur l'ensemble mésonéphros et gonades pour les stades 47 à 52 et sur les gonades seules pour les stades 53 à 56.

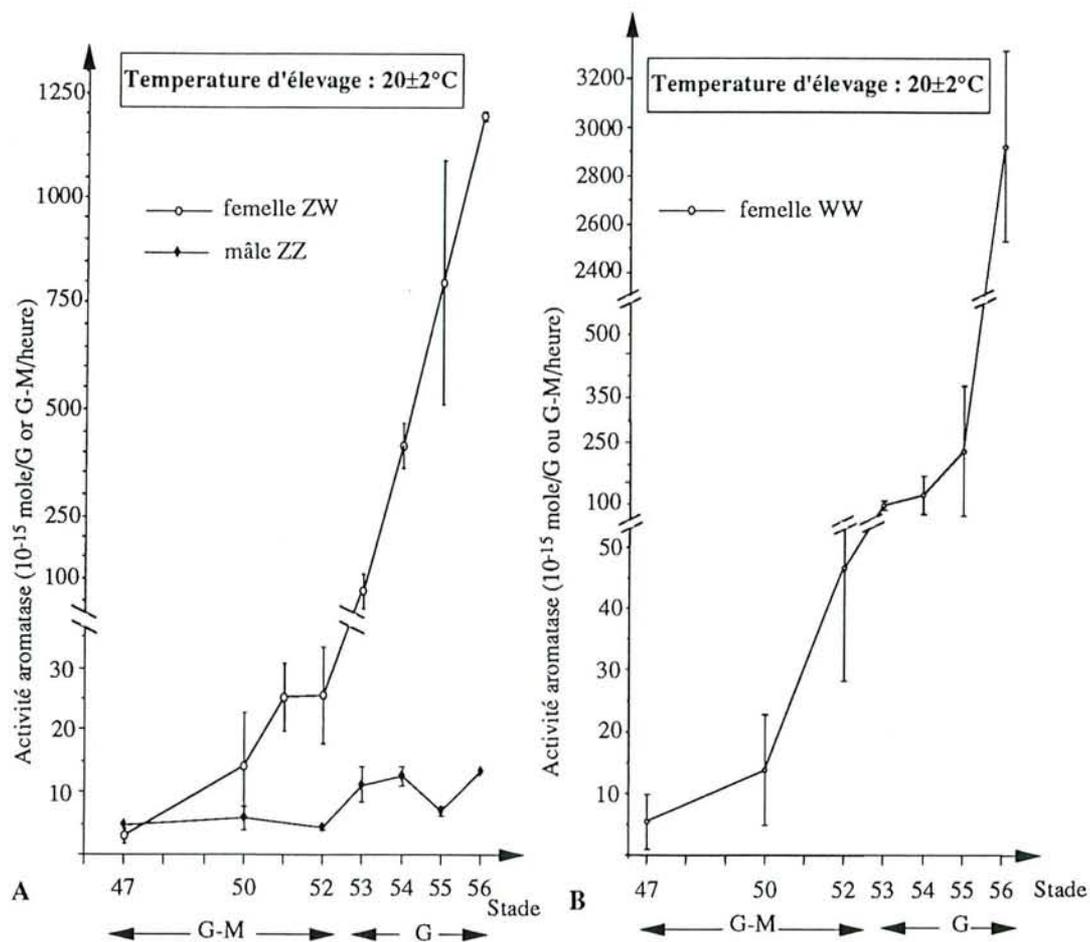


Fig. 14 : Activité aromatasé dans les complexes gonado-mésonéphrétiques (G-M) et dans les gonades (G) de larves au cours de la différenciation sexuelle. A : Larves ZW et ZZ. B : Larves WW. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type de plusieurs dosages (les valeurs des dosages sont données en annexe à la fin du document).

Les différences entre les activités des larves ZW et des larves ZZ ne sont pas significatives pour les stades 47 ($p=0,39$) et 50 ($p=0,27$) et significatives pour les stades ultérieurs ($p=0,006$ au stade 52, $p=0,0001$ au stade 53 et $p<0,0001$ aux stades 54 à 56). Les différences entre les activités des larves ZW et des larves WW ne sont pas significatives pour les stades 47 ($p=0,29$), 50 ($p=0,91$), 52 ($p=0,054$) et 53 ($p=0,17$) et significatives pour les stades ultérieurs ($p=0,0009$ au stade 54, $p=0,01$ au stade 55 et $p=0,039$ au stade 56).

L'activité aromatasase a été détectée dès le stade 47, soit bien avant la différenciation histologique du sexe des gonades. A ce stade, l'activité est faible dans les trois types de larves. L'écart d'activité entre différenciations ovarienne et testiculaire apparaît dès le stade 50, où l'activité aromatasase est environ deux fois plus forte chez les femelles que chez les mâles. Cette activité reste faible chez les mâles (aux environs de 10 fmoles/gonade/heure) alors qu'elle augmente très fortement chez les femelles : elle est environ 40 fois et 90 fois plus forte que celle des mâles aux stades 54 et 56.

2- Influence de la température sur la différenciation sexuelle et l'activité aromatasase.

Chez *Pleurodeles waltl*, l'élevage des larves à 32°C pendant la période thermosensible provoque la différenciation des larves ZW en néomâles et ne semble pas affecter la différenciation des larves ZZ.

Chez les larves WW, l'activité aromatasase est comparable à celle des larves ZW : elle marque cependant une stagnation aux stades 54 et 55 pour réaugmenter très fortement et dépasser l'activité des larves ZW au stade 56 (Fig. 14B).

L'activité des tissus témoins, mésonéphros et corps gras au stade 54, est faible : 1,1 et 1,34 fmoles/mésonéphros/heure chez un mâle ZZ et chez une femelle ZW et 2,41 et 5,19 fmoles/corps gras/heure chez un mâle ZZ et chez une femelle ZW.

L'activité aromatasase des gonades de larves en cours de traitement thermique a été suivie du stade 52 au stade 56 chez des larves ZZ et ZW (Fig. 15).

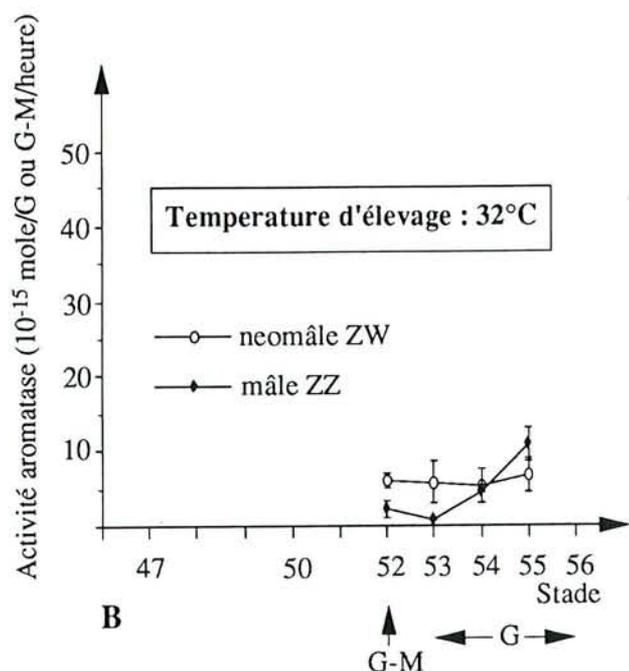


Fig. 15 : Activité aromatasase dans les complexes gonado-mésonephrétiques (G-M) et dans les gonades (G) de larves au cours de la différenciation sexuelle lors d'un élevage à 32°C. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type de plusieurs dosages (les valeurs des dosages sont données en annexe). Les différences entre les activités des neomâles ZW et des femelles ZW élevées à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Fig. 14A) sont significatives ($p=0,0023$ pour le stade 52, $p=0,0003$ pour le stade 53 et $p<0,0001$ pour les stades 54 et 55).

Les activités aromatasase des complexes gonado-mésonephrotiques (stade 52) et des gonades (stades 53 à 55) ne sont pas significativement différentes entre les larves ZZ et les larves ZW. Ces activités ne sont pas différentes des activités observées chez les larves ZZ élevées à température ambiante.

En revanche, les activités des trois types de larves (ZZ et ZW à 32°C et ZZ à 20°C), caractéristiques d'une différenciation testiculaire sont largement inférieures à celles observées

lors d'une différenciation ovarienne (larves ZW à 20°C).

L'effet de la température sur la différenciation sexuelle des larves WW n'a pu être étudié : en effet, chez ces animaux, le traitement thermique pour l'inversion sexuelle est léthal ; les larves WW meurent quelques jours après le début du traitement.

L'effet d'un choc thermique de 48 heures à 32°C sur l'activité aromatasase de larves femelles a été étudié à différentes stades (Fig. 16).

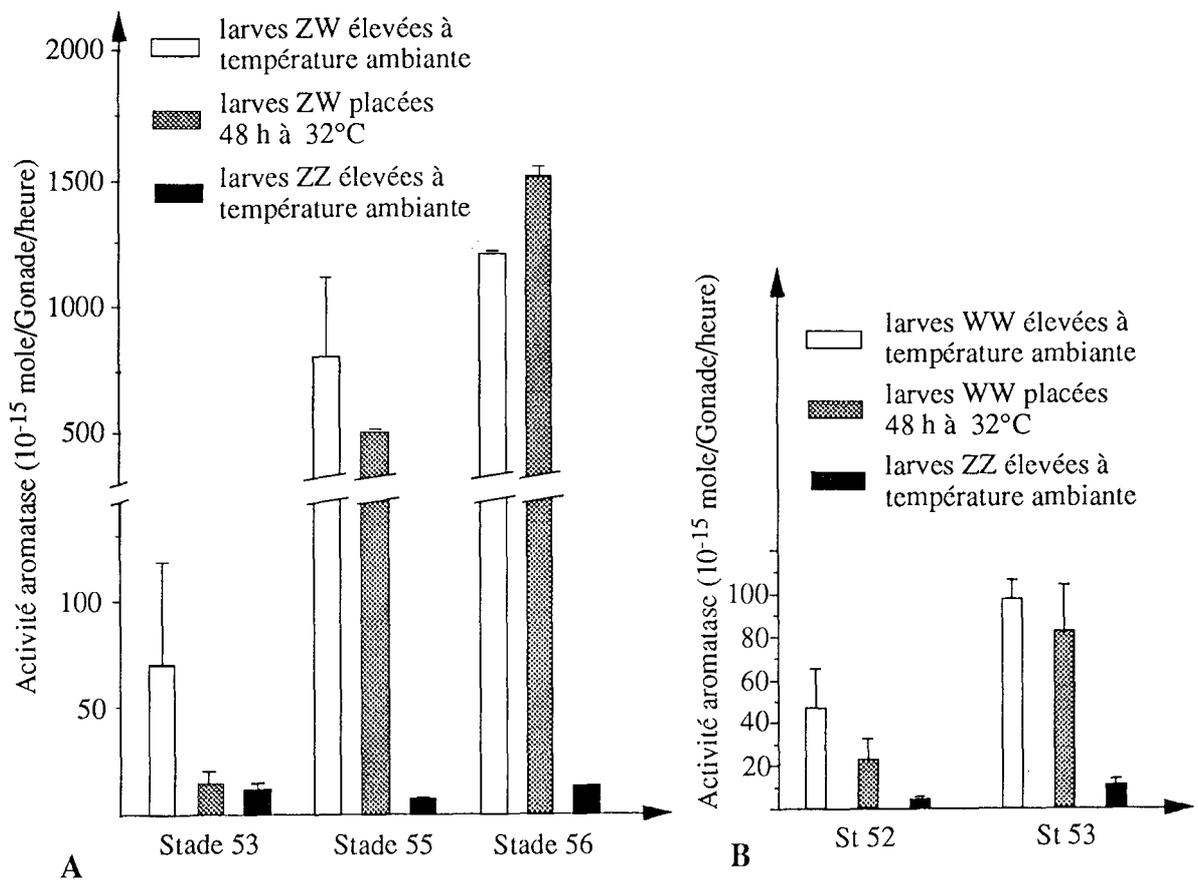


Fig. 16 : Action d'un choc thermique de 48 heures à 32°C sur l'activité aromatasase de gonades de larves ZW (A) et WW (B). Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type de plusieurs dosages (les valeurs des dosages sont données en annexe). La comparaison statistique des activités est donnée dans le tableau suivant:

| | | | | | | | |
|----------|-----------------|---------|----|----------|----------------|---------|----|
| stade 53 | ZZ vs ZW 32°C : | 0,56 | NS | stade 52 | ZZ vs WW32°C : | 0,005 | S |
| | ZW vs ZW 32°C : | <0,0001 | S | | WW vs WW32°C : | 0,64 | NS |
| stade 55 | ZZ vs ZW 32°C : | 0,0003 | S | stade 53 | ZZ vs WW32°C : | <0,0001 | S |
| | ZW vs ZW 32°C : | 0,32 | NS | | WW vs WW32°C : | 0,30 | NS |
| stade 56 | ZZ vs ZW 32°C : | <0,0001 | S | | | | |
| | ZW vs ZW 32°C : | 0,0073 | S | | | | |

Chez les femelles ZW, lorsque le choc thermique est réalisé pendant la période thermosensible (stade 53), l'activité aromatasase est fortement diminuée et est comparable à celle observée chez les mâles. En revanche, lorsque le choc thermique est appliqué après la

période thermosensible, l'activité aromatasase est inchangée (stade 55, $p=0,32$) voire légèrement augmentée (stade 56, $p=0,0073$).

Chez les femelles WW, un choc thermique de 48 heures à 32°C n'a pas d'effet sur l'activité aromatasase.

à quel stade?

3- Influence de l'oestradiol sur la différenciation sexuelle.

3.1- Effets d'un traitement à l'oestradiol sur la différenciation sexuelle.

Des larves de génotype mâle ZZ ont été inversées en femelles par un traitement à l'oestradiol à une concentration de 100 µg/l d'eau d'élevage. L'effet de fortes concentrations d'oestradiol (1,5 mg/l) a aussi été étudié sur des larves de génotype ZZ et ZW (Tableau 3).

Pour tous les traitements à l'oestradiol, la mortalité est de l'ordre de 1/4 à 1/3 des animaux. Cette mortalité est peu différente de celle observée pour l'élevage de larves normales ; elle correspond en majorité au

cannibalisme, aux épidémies de champignons, fréquentes chez les larves, et à la mortalité au moment de la métamorphose. De même, la vitesse de développement, qui correspond à la durée du traitement (temps mis pour atteindre la métamorphose) n'est pas différente de celle de larves non traitées.

Le traitement de larves ZZ par de l'oestradiol à une concentration de 100 µg/l provoque l'inversion sexuelle de quasiment tous les individus en femelles fonctionnelles (Fig. 17C). De nombreux individus ne présentent cependant qu'un seul oviducte.

| Génotype des larves | Concentration d'oestradiol | Période du traitement | Durée du traitement | Nombre de larves traitées | Mortalité pendant le traitement | Mâles | Femelles |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|-------|----------|
| ZZ | 100 µg/l | St 52 --> St 55-56 | 80 jours | 64 | 14 22% | 2 | 48 |
| ZZ | 1,5 mg/l | St 52 --> St 55-56 | 90 jours | 42 | 9 21% | 0 | 33 |
| ZW | 1,5 mg/l | St 52 --> St 55-56 | 85 jours | 32 | 11 34% | 0 | 21 |

Tableau 3 : Effets de traitements à l'oestradiol sur la différenciation sexuelle.

De même, à une concentration de 1,5 mg/l, l'oestradiol inverse toutes les larves de génotype mâle en femelles, mais, cette fois, l'inversion n'est pas fonctionnelle car les animaux inversés ne présentent pas d'oviductes (Fig. 17D). Des larves de

génotype femelle traitées à la même concentration montrent le même phénotype : la différenciation ovarienne ne semble pas perturbée mais le développement des oviductes est inhibé (Fig. 17E).

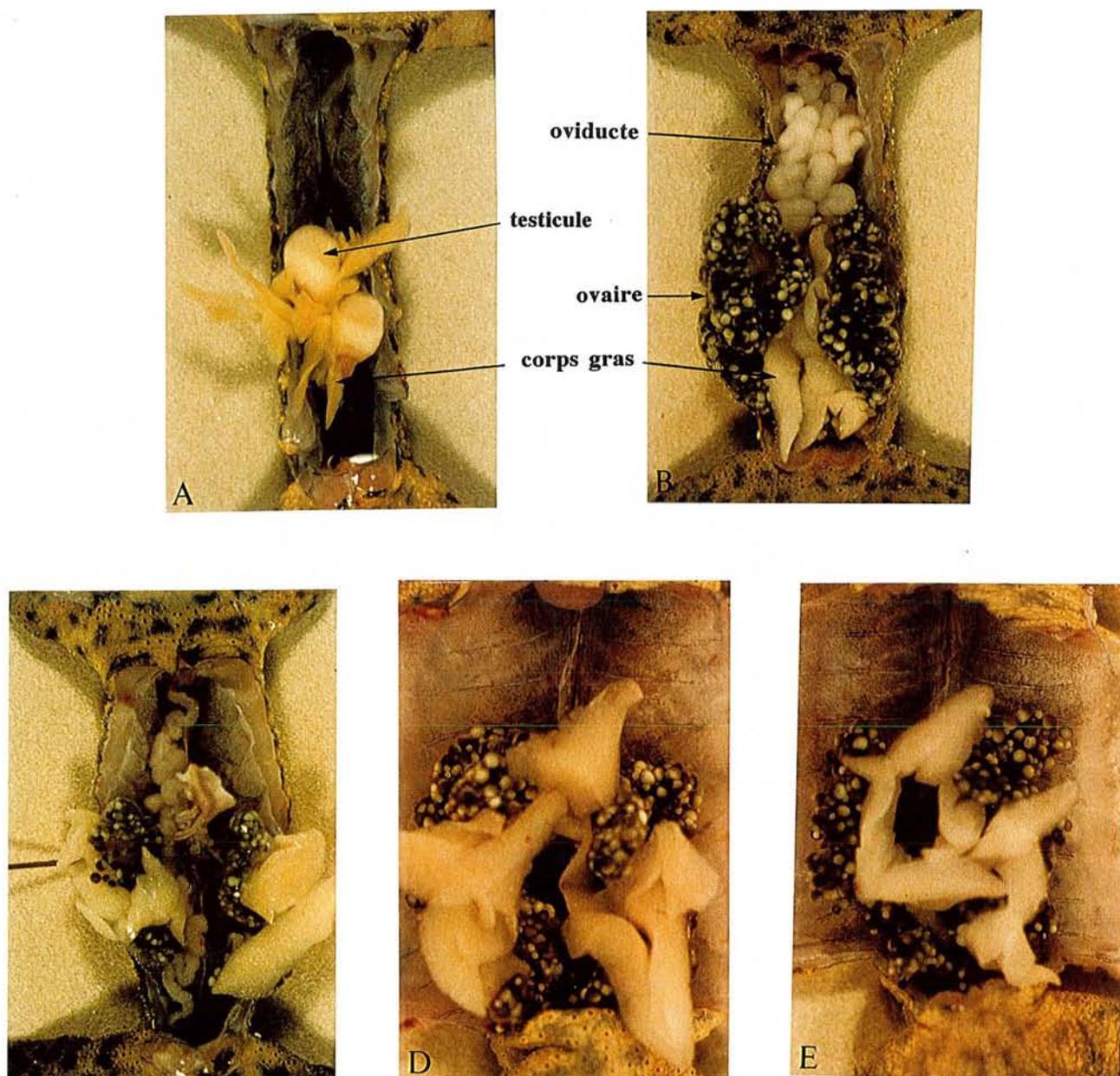


Fig. 17 : Effets de traitements à l'oestradiol sur la différenciation sexuelle.

A : mâle, B : femelle, C : mâle traité à l'oestradiol 100 µg/l, D : mâle traité à l'oestradiol 1,5 mg/l, E : femelle traitée à l'oestradiol 1,5 mg/l.

3.2- Influence de l'oestradiol sur l'activité aromatase.

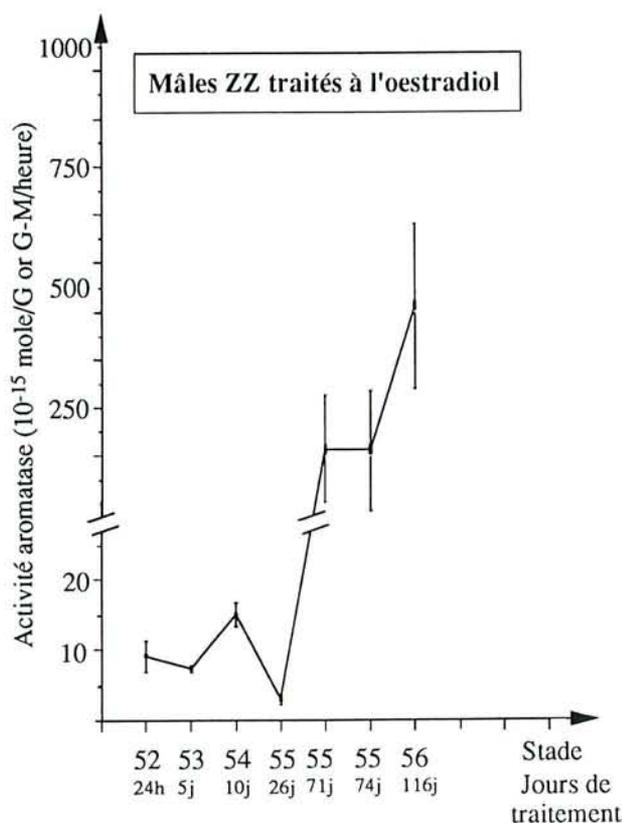


Fig. 18 : Activité aromatase de larves ZZ au cours de l'inversion sexuelle par un traitement à l'oestradiol. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type de plusieurs dosages (les valeurs des dosages sont données en annexe).

Au cours de l'inversion des mâles par l'oestradiol à 100 $\mu\text{g/l}$, l'activité aromatase a été mesurée à différents stades. Les résultats sont donnés sur la figure 18.

Pendant le traitement à l'oestradiol, l'activité aromatase des larves ZZ reste faible et comparable à celle des larves ZZ non traitées jusqu'au stade 55, soit près de 26 jours après le début du traitement. L'activité aromatase

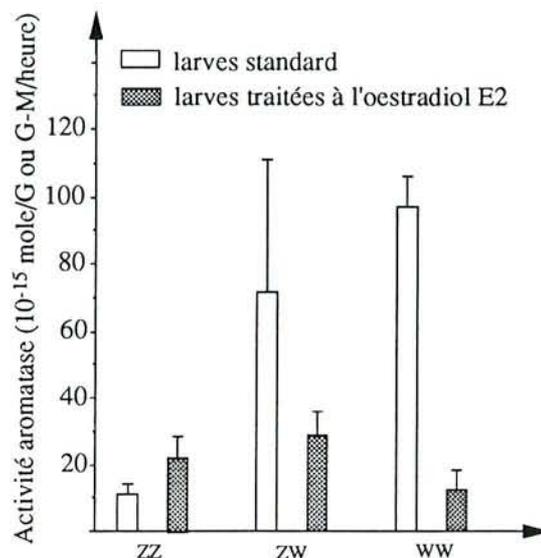


Fig. 19 : Effet de l'oestradiol sur l'activité aromatase gonadique de larves ZZ, ZW et WW au stade 53. Les valeurs représentent le moyenne \pm l'écart-type de plusieurs dosages (les valeurs des dosages sont données en annexe). La comparaison statistique des activités est donnée dans le tableau suivant :

| | | | | |
|----|---------|---|----------|----|
| ZZ | vs ZW | : | p=0,0001 | S |
| ZZ | vs ZZE2 | : | p=0,044 | S |
| ZW | vs ZZE2 | : | p=0,018 | S |
| ZZ | vs ZW | : | p=0,0002 | S |
| ZZ | vs ZWE2 | : | p=0,025 | S |
| ZW | vs ZWE2 | : | p=0,043 | S |
| ZZ | vs WW | : | p=0,0004 | S |
| ZZ | vs WWE2 | : | p=0,82 | NS |
| WW | vs WWE2 | : | p=0,0003 | S |

augmente ensuite mais reste inférieure à celle observée aux mêmes stades chez les femelles. L'augmentation de l'activité aromatase, caractéristique de la différenciation femelle, se produit ainsi tardivement par rapport au début du traitement.

L'effet d'un traitement à l'oestradiol sur l'activité aromatasase a été étudié sur des larves de génotype ZZ, ZW et WW. Des larves des trois génotypes ont été traitées au stade 53 par l'oestradiol à une concentration de 400 µg/ml. Au bout de quatre jours de traitement, les larves ont été sacrifiées et l'activité aromatasase gonadique mesurée (Fig. 19).

Le traitement de larves ZZ au stade 53 par une concentration d'oestradiol de 400 µg/l provoque l'augmentation de l'activité

aromatasase. L'activité des mâles traités est significativement supérieure à celle des larves mâles non traitées ($p=0,044$) mais est inférieure à celle des larves femelles ZW ($p=0,018$). Chez les femelles ZW, l'activité aromatasase est diminuée par le traitement à l'oestradiol ($p=0,043$).

Chez les femelles WW traitées, l'activité aromatasase est fortement diminuée ($p=0,0004$) et se retrouve au même niveau que l'activité des mâles ZZ non traités ($p=0,82$).

3-3- Influence du tamoxifène sur la différenciation sexuelle.

| Génotype des larves | Concentration du tamoxifène | Période du traitement | Durée du traitement | Nombre de larves traitées | Mortalité pendant le traitement | Mâles | Femelles |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|-------|----------|
| ZZ | 100 µg/l | St 52 --> St 55 | 95 jours | 65 | 35 54% | 30 | 0 |
| ZW | 100 µg/l | St 52 --> St 55 | 95 jours | 45 | 28 62% | 2 | 15 |

Tableau 4 : Effets du tamoxifène sur la différenciation sexuelle.

Afin de préciser l'implication des oestrogènes dans la différenciation sexuelle, des traitements de larves ont été réalisés avec un antioestrogène, le tamoxifène (Tableau 4).

Contrairement aux traitements à l'oestradiol, le traitement au tamoxifène comporte une forte toxicité comme en témoignent l'importante mortalité au cours de l'expérience (supérieure à 50%) et la faible vitesse de développement observée. Ceci nous a conduit à choisir une faible concentration de

tamoxifène (100 µg/l) et à arrêter le traitement au milieu du stade 55.

Dans ces conditions, seules deux larves ZW sur les 17 survivantes ont été inversées en mâles. Aucune larve ZZ n'a été inversée en femelle : chez le pleurodèle, le tamoxifène ne semble pas présenter d'activité oestrogénique. Mais ces résultats nécessitent d'être confirmés par d'autres expériences avec des concentrations plus élevées mais compatibles avec la survie des larves.

4- Influence d'inhibiteurs de l'aromatase sur la différenciation sexuelle.

4.1- Influence des inhibiteurs sur l'activité aromatase.

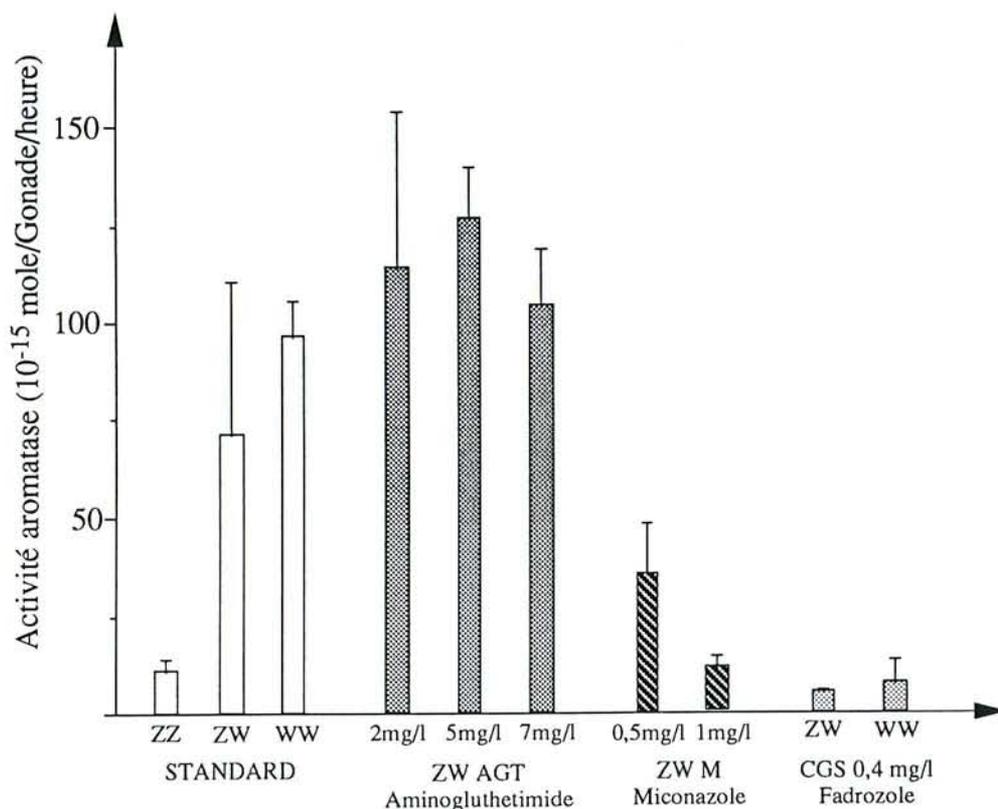


Fig. 20 : Effets d'inhibiteurs d'aromatase sur l'activité aromatase gonadique de larves femelles au stade 53. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart-type de plusieurs dosages (les valeurs des dosages sont données en annexe). La comparaison statistique des activités est donnée dans le tableau suivant :

| | | | |
|-------------------------|----|-------------------------|----|
| ZW AGT2 vs ZW : p=0,11 | NS | ZW M0,5 vs ZW : p=0,33 | NS |
| ZW AGT5 vs ZW : p=0,048 | S | ZW M1 vs ZW : p<0,0001 | S |
| ZW AGT7 vs ZW : p=0,23 | NS | ZW M1 vs ZZ : p=0,82 | NS |
| ZW CGS vs ZW : p<0,0001 | S | WW CGS vs WW : p=0,0003 | S |
| ZW CGS vs ZZ : p=0,06 | NS | WW CGS vs ZZ : p=0,085 | NS |

Les effets de trois inhibiteurs ont été testés sur l'activité aromatase gonadique du pleurodèle afin de choisir le plus efficace pour le traitement des larves (Fig. 20).

Trois inhibiteurs ont été choisis : l'aminogluthetimide (Thompson et Siiteri, 1973), le nitrate de miconazole (Mason *et al.*, 1985) et le fadrozole (Bhatnagar *et al.*, 1990).

Ces inhibiteurs ont été testés sur des larves femelles au stade 53. Après deux jours de traitement, l'activité aromatase est dosée.

A la concentration de 2, 5 ou 7 mg/l, l'aminogluthetimide n'entraîne aucune diminution de l'activité aromatase. A la concentration de 5 mg/l, l'activité aromatase est même significativement supérieure à celle des larves standard (p=0,048).

Le nitrate de miconazole à la concentration de 500 µg/l provoque une légère diminution de l'activité aromatase mais la différence n'est pas significative ($p=0,36$). En revanche, après un traitement à 1 mg/l, l'activité aromatase est différente de celle des

larves ZW non traitées ($p=0,0003$) et n'est pas différente de celle des larves ZZ ($p=0,82$).

De même, le fadrozole, à la concentration de 400 µg/l, diminue l'activité aromatase de larves ZW au niveau de celle de larves ZZ ($p=0,06$). Le même effet est observé chez les larves WW.

4.2- Influence des inhibiteurs d'aromatase sur la différenciation sexuelle.

4.2.1- Effet du miconazole.

| Génotype des larves | Concentration du miconazole | Période du traitement | Durée du traitement | Nombre de larves traitées | Mortalité pendant le traitement | Mâles | Femelles |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|-------|----------|
| ZZ | 500 µg/l | St 51 | 3 jours | 15 | 15 100% | | |
| ZZ | 400 µg/l | St 51 | 3 jours | 13 | 13 100% | | |
| ZW | 500 µg/l | St 51 | 3 jours | 14 | 14 100% | | |
| ZW | 250 µg/l | St 52 --> St 55 | 95 jours | 67 | 44 66% | 0 | 23 |

Tableau 5 : Effet du miconazole sur la différenciation sexuelle.

Après les tests précédents, deux inhibiteurs ont été choisis pour tenter des inversions sexuelles chez le pleurodèle : le nitrate de miconazole et le fadrozole.

Les dosages d'activité aromatase ont montré que la concentration minimale efficace de miconazole se situe entre 0,5 et 1 mg/l.

Néanmoins, les premiers essais ont montré que ces concentrations étaient très toxiques et entraînaient la mort de toutes les larves traitées en quelques jours (Tableau 5).

A la concentration de 250 µg/l, la mortalité est encore très forte (66%) : les larves ZW traitées à cette concentration présentent une différenciation sexuelle femelle normale.

4.2.2- Effet du fadrozole.

| Concentration du fadrozole | Période du traitement | Durée du traitement | Nombre de larves traitées | Mortalité | Génotype (déterminé après traitement) | Mâles | Inter sexuels | Femelles |
|----------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|-----------|---------------------------------------|-------|---------------|----------|
| 100 µg/l | St 52 --> St 55 | 110 jours | 72 | 31 42% | ZZ | 23 | 23 | 0 |
| | | | | | ZW | 17 | 1 | 15 |
| 300 µg/l | St 52 --> St 55-56 | 120 jours | 80 | 30 37% | ZZ | 11 | 11 | 0 |
| | | | | | ZW | 30 | 9 | 1 |
| | | | | | WW | 9 | 1 | 0 |

Tableau 6 : Effet du fadrozole sur la différenciation sexuelle.

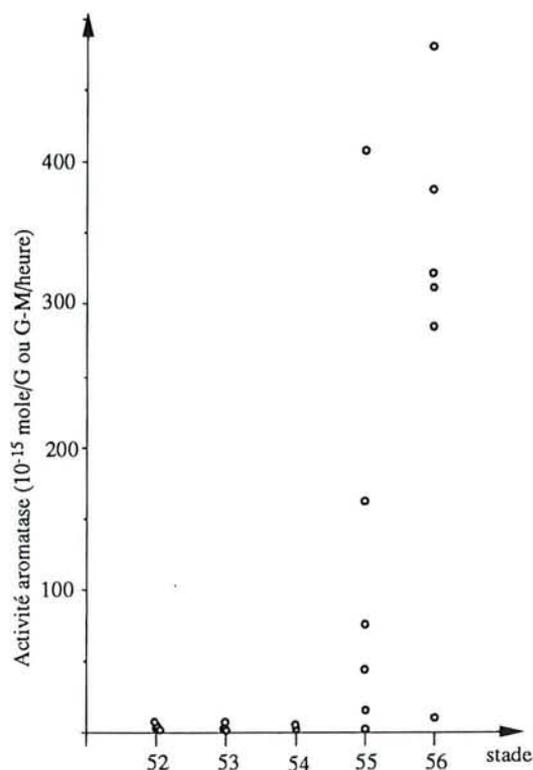


Fig. 21 : Effet du fadrozole sur l'activité aromatasique au cours d'un traitement à 300 µg/l pendant la différenciation sexuelle. Chaque point représente un dosage réalisé sur les deux gonades d'un individu.

Le dosage de l'activité aromatasique au cours du traitement par le fadrozole montre que, jusqu'au stade 54, l'aromatasique est inhibée : l'activité est faible et caractéristique du phénotype mâle (Fig. 21). A partir du stade 55, de nombreuses larves présentent une activité élevée caractéristique du phénotype femelle mais bien inférieure pour la plupart à l'activité de femelles standard. Certaines larves gardent une activité faible, inférieure à 15 fmoles/gonade/heure : ces larves correspondent aux individus inversés en mâles (Fig. 23).

Le fadrozole possède une toxicité relativement forte sur les larves : près de 40% d'entre elles sont mortes au cours du traitement (Tableau 6). La vitesse de développement est également très ralentie puisque les larves traitées mettent près de deux fois plus de temps (4 mois) pour passer du stade 52 à la métamorphose que des larves non traitées.

La différenciation mâle ne semble pas perturbée par le fadrozole : toutes les larves ZZ traitées se sont développées en mâles.

A la concentration de 100 $\mu\text{g/l}$, une larve ZW, sur les 17 survivantes présentait des testicules à la métamorphose et un intersexué a

été observé. En revanche, à la concentration de 300 $\mu\text{g/l}$, un tiers des larves ZW ont différencié des testicules (Fig. 22), et une larve WW a également été inversée en mâle.

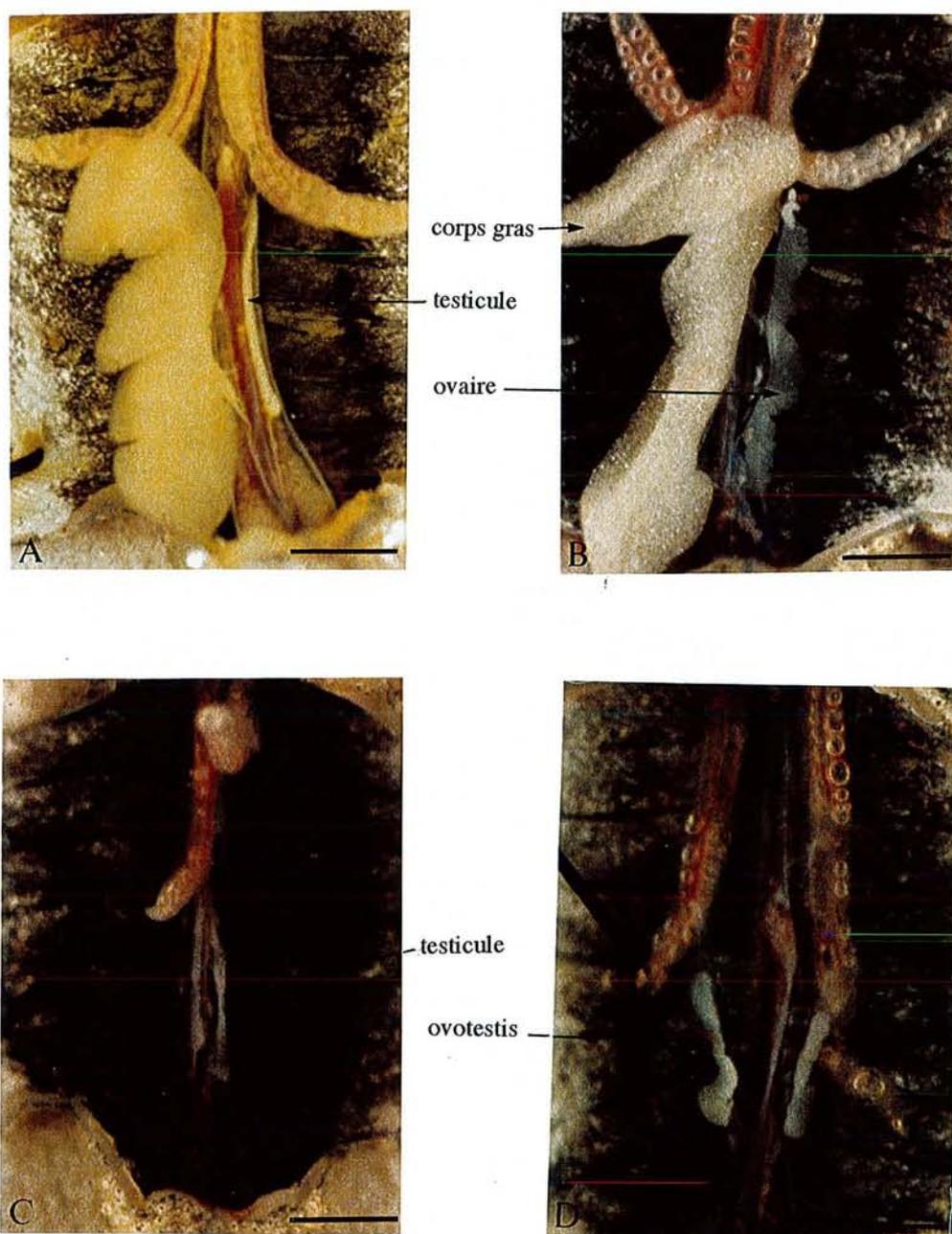


Fig. 22 : Influence du fadrozole sur la différenciation sexuelle : dissection de juvéniles au stade 56 après traitement.

A : Juvénile ZZ mâle. B : Juvénile ZW femelle. C : Juvénile ZW traité au fadrozole et inversé en mâle. D : Juvénile ZW intersexué traité au fadrozole.

La barre représente 0,5 cm.

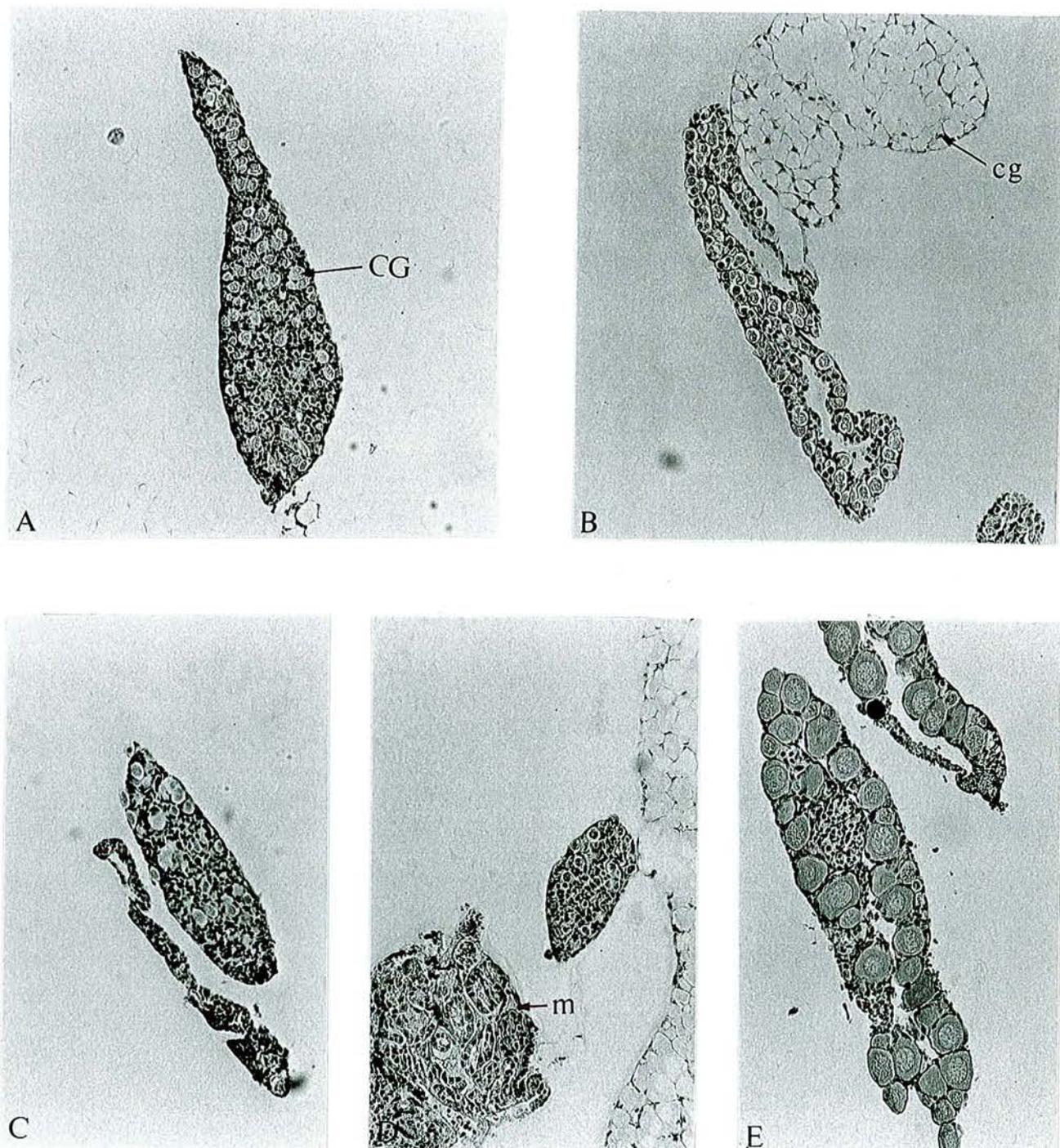


Fig. 23 : Influence du fadrozole sur la différenciation sexuelle : coupes histologiques de gonades de larves traitées et non traitées au stade 55.

A : Testicule (Gx100). **B :** Ovaire (Gx100). **C :** Testicule de larve ZZ traitée au fadrozole (Gx100). **D :** Testicule de larve ZW traitée au fadrozole (Gx100). Activité aromatase : 2,5 fmoles/gonade/heure. **E :** Ovaire de larve ZW traitée au fadrozole (Gx100). Activité aromatase : 489 fmoles/gonade/heure

CG : cellule germinale ; cg : corps gras ; m : mésonephros.

Au stade 56, qui correspond à la métamorphose, le sexe des gonades est facilement distinguable.

Le testicule présente une partie antérieure, qui est rattachée au poumon, très effilée : au fur et à mesure de la différenciation testiculaire, cette partie régressera. La partie postérieure est plus arrondie, plus globuleuse, c'est cette partie qui donnera le testicule chez l'adulte (Fig. 22a). La morphologie de l'ovaire à ce stade est plus homogène : il se présente sous la forme d'une bandelette beaucoup plus large que le testicule, aplatie et festonnée. L'ovaire est également en général plus long que le testicule.

La morphologie des testicules des animaux ZW inversés par le fadrozole ne se distingue pas de celle des testicules des animaux ZZ. Des intersexués ont été observés : chez ces animaux, les gonades présentent une partie antérieure large typique de l'ovaire et une partie postérieure globuleuse caractéristique du testicule.

La structure histologique des gonades des animaux traités au fadrozole a aussi été étudiée (Fig. 23).

5- Influence de la dihydrotestostérone sur la différenciation sexuelle.

L'intervention de l'aromatase et des oestrogènes dans la différenciation sexuelle étant démontrée, nous avons vérifié si un androgène non aromatisable, la dihydrotestostérone, exerce, comme la testostérone, un effet paradoxal ou peut provoquer l'inversion de femelles génétiques

Les larves ZZ traités présentent des testicules normaux : des gonades arrondies, pleines, avec des cellules germinales situées au milieu de la gonade (le testicule se développe à partir de la médulla des gonades indifférenciées) (Fig. 23c).

De nombreuses larves ZW traitées ont quand même développé des ovaires semblables à ceux des femelles témoin (Fig. 23e). L'ovaire est aplati, large, avec une lumière au centre et des cellules germinales - ici, le développement des ovocytes a commencé - situées à la périphérie de la gonade (l'ovaire se développe à partir du cortex de la gonade indifférenciée). Ces ovaires présentent une activité aromatase élevée.

Certaines larves ZW traitées ont différencié des testicules dont l'activité aromatase est faible. Ainsi, l'activité aromatase est en rapport avec la différenciation des gonades : élevée chez les larves non inversées et présentant une différenciation ovarienne et faible chez les larves inversées et présentant une différenciation testiculaire.

en mâles. Pour cela, des larves descendant d'un croisement entre un thermonéomâle et une femelle standard, ont été traitées du stade 52 à la fin du stade 55 par la dihydrotestostérone à une concentration de 500 µg/l.

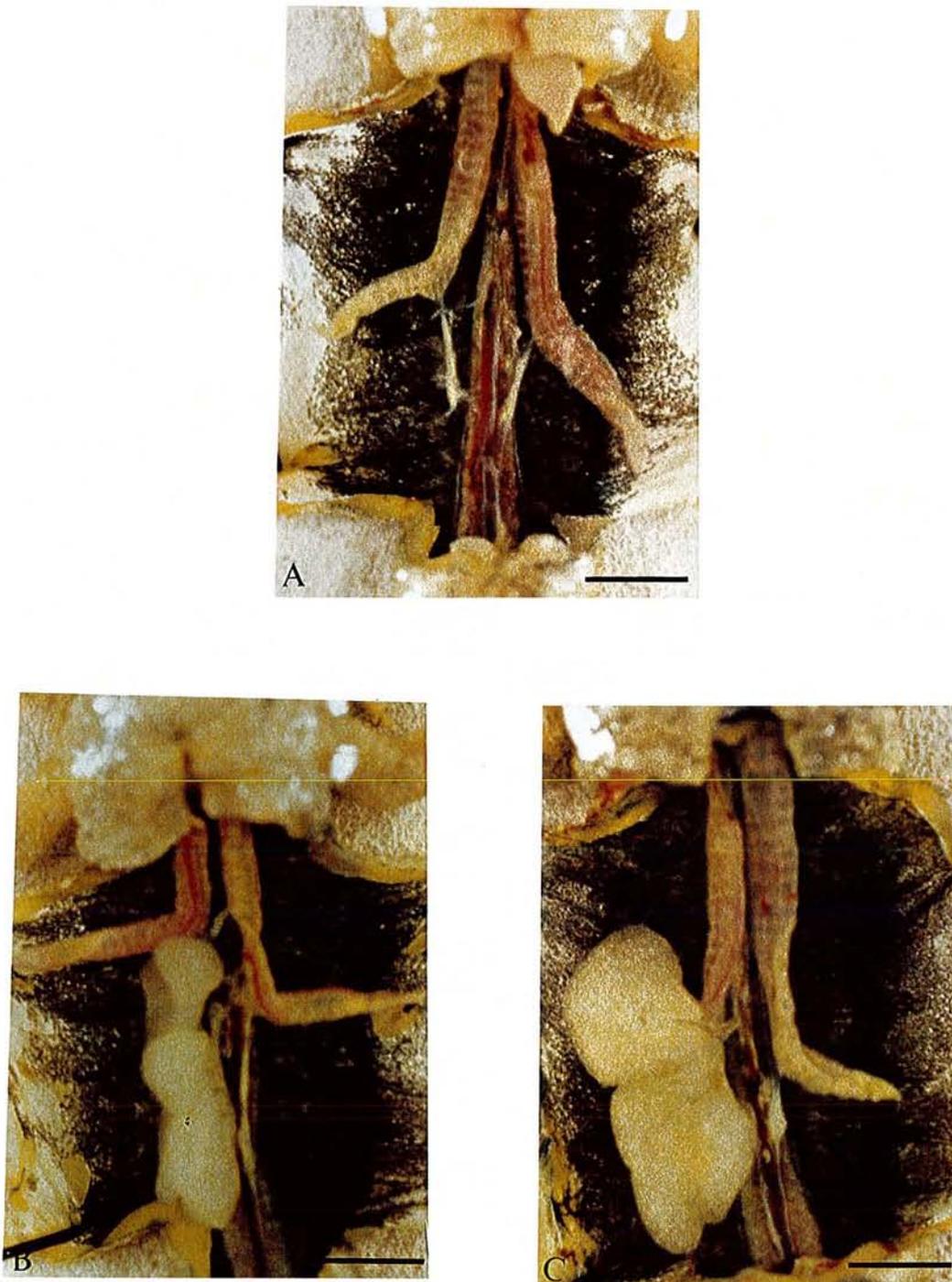


Fig. 24 : Influence de la dihydrotestostérone sur la différenciation sexuelle : dissection de juvéniles ayant subi un traitement à la DHT.

A : juvénile ZZ traité. B : juvénile ZW inversé en mâle. C : juvénile WW inversé en mâle.

La barre représente 0,5 cm.

| Concentration de la DHT | Période du traitement | Durée du traitement | Nombre de larves traitées | Mortalité | Génotype (déterminé après traitement) | mâle | Inter sexué | Femelle | |
|-------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|-----------|---------------------------------------|------|-------------|---------|---|
| 500 µg/l | st 52 --> st 55-56 | 120 jours | 80 | 22 27% | ZZ | 9 | 6 | 0 | 0 |
| | | | | | ZW | 35 | 24 | 3 | 4 |
| | | | | | WW | 14 | 7 | 1 | 3 |

Tableau 7 : Influence de la dihydrotestostérone sur la différenciation sexuelle.

Au cours de ce traitement, la mortalité fut légèrement supérieure à celle des larves standard, mais les larves ont mis plus de quatre mois pour atteindre la métamorphose (contre deux mois pour des larves non traitées).

Chez les larves de génotype ZZ, aucun effet paradoxal n'a été observé : tous les juvéniles examinés présentent des testicules (Tableau 7). Cependant ces testicules présentent un aspect différent de ceux des mâles non traités : seule la partie postérieure globuleuse, qui donnera le testicule chez

l'adulte, semble présente ; la partie antérieure effilée semble avoir déjà régressé (Fig. 24).

La majorité des animaux ZW et WW traités ont différencié des testicules. Là aussi, ces testicules ne présentent que la partie postérieure. La structure histologique des testicules qui se sont formés sous l'influence de la DHT montre un très net déficit en cellules germinales chez tous les animaux traités (Fig. 25). Les testicules des larves de génotype femelle, ZW et WW, sont très petits et semblent fusionnés pour certains avec les corps gras.

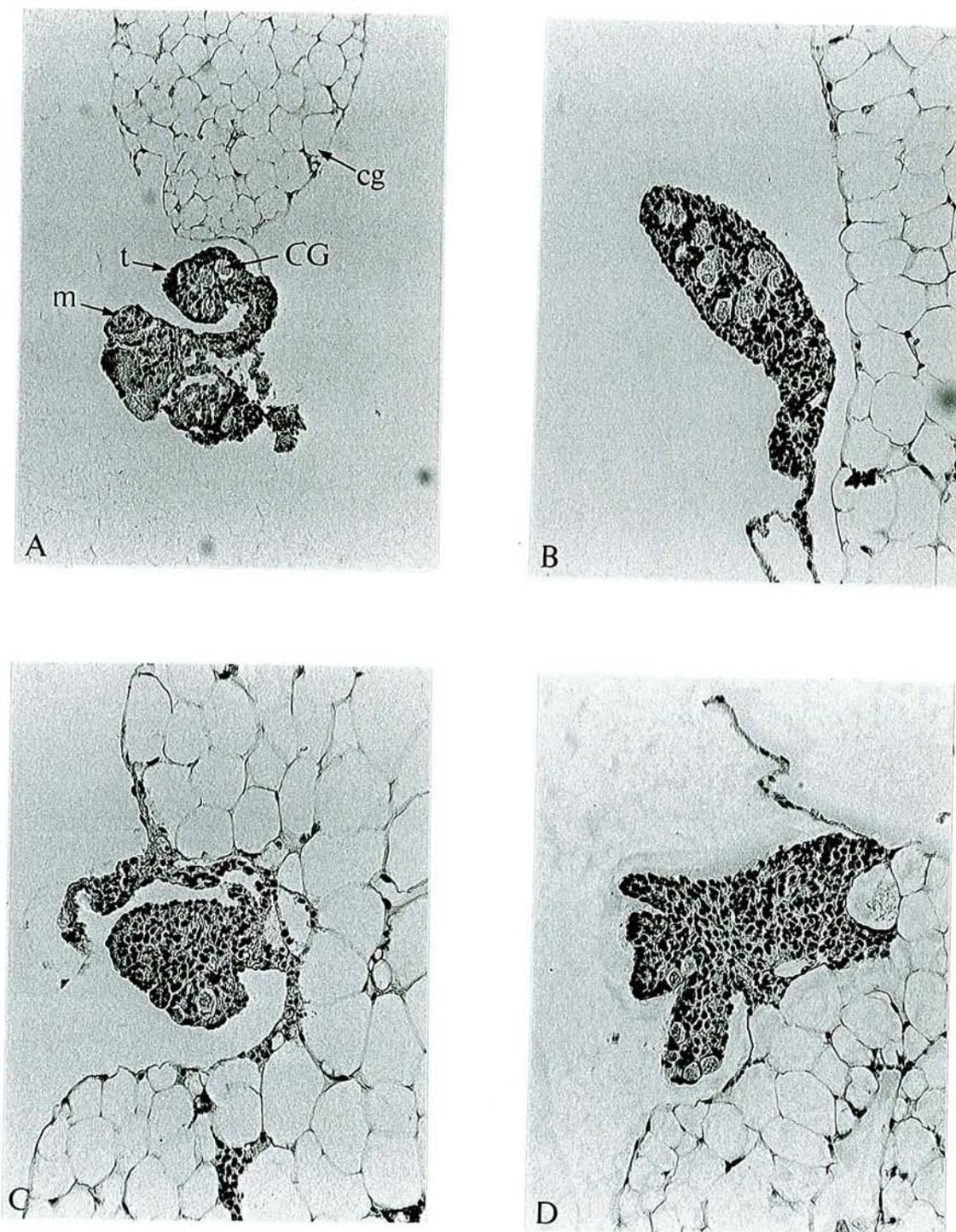


Fig. 25 : Influence de la dihydrotestostérone sur la différenciation sexuelle : Coupes histologiques de gonades de mâle ZZ et de femelles ZW et WW traitées à une concentration de 600 $\mu\text{g/l}$.

A : mâle ZZ (Gx100). B : femelle ZW inversée (Gx125). C et D : femelles WW inversées (Gx125).

m : mésonephros ; cg : corps gras ; CG : cellule germinale ; t : testicule.

Conclusion.

Activité aromatasase au cours de la différenciation sexuelle.

L'activité aromatasase dans les gonades de pleurodèle a été détectée dès le stade 47. Les dosages n'ont pu être réalisés aux stades précédents du fait de la très petite taille des gonades. Néanmoins, une étude des stades précoces de l'organogenèse gonadique se révélerait très intéressante. Cette étude pourrait être entreprise par une approche moléculaire. Des hybridations sur northern blot avec une sonde ADNc de l'aromatasase humaine ont montré la présence de transcrits homologues dans les gonades de pleurodèle, mais les résultats sont trop fragmentaires pour permettre une analyse fiable de l'expression de l'aromatasase. Cette analyse nécessite le clonage de l'ADNc de l'aromatasase chez le pleurodèle. Le criblage d'une banque d'ADNc d'ovaire de pleurodèle par hybridation avec la sonde humaine ou par PCR n'a malheureusement pas permis d'isoler un clone de l'aromatasase. Ces expériences sont encore à poursuivre.

Une différence entre les sexes est observée au niveau de l'activité aromatasase dès le stade 50 mais la différence n'est statistiquement significative qu'à partir du stade 52. Une différence dans le métabolisme des stéroïdes entre les sexes existe donc avant la différenciation histologique du sexe des

gonades qui commence au stade 53. Ceci apporte une première preuve que les oestrogènes sont impliqués dans la différenciation sexuelle des gonades.

L'activité aromatasase mesurée dans les ovaires au stade 56 est considérable : entre 1000 et 3000 fmol/gonade/heure selon le génotype ZW ou WW de la femelle. A titre comparatif, l'activité mesurée dans les ovaires en différenciation chez la tortue *Dermochelys coriacea* se situe au maximum aux environs de 250 fmol/gonade/heure (Desvages *et al.*, 1993). Chez *Alligator mississippiensis*, l'activité aromatasase ovarienne est au maximum de 450 fmol/gonade+mésonephros+surrénale/heure (Smith *et al.*, 1995). L'importante activité aromatasase chez le pleurodèle accentue encore le rôle des oestrogènes dans la différenciation sexuelle de cette espèce.

Enfin, l'évolution de l'activité aromatasase chez la femelle est différente selon le génotype ZW ou WW, ce qui semble indiquer que l'expression de l'aromatasase est régulée par un mécanisme génétique directement lié au chromosome W. Cependant, il est curieux de constater que l'activité aromatasase des larves WW est plus faible que celle des larves ZW aux stades 54 et 55, et plus forte au stade 56.

Effet de la température sur l'activité aromatasase.

Chez *Pleurodeles waltl*, une température d'élevage élevée inverse les femelles en mâles. Cette inversion est morphologique, et aussi endocrinienne : les larves ZZ et ZW élevées à 32°C présentent une activité aromatasase comparable à celle des larves ZZ élevées à température ambiante. Ainsi, une activité aromatasase faible (<15 fmol/gonade/heure) est caractéristique d'une différenciation testiculaire.

L'effet du choc thermique montre bien que la température agit directement ou indirectement sur l'aromatasase, et que la baisse de l'activité aromatasase chez les femelles élevées à 32°C n'est pas une simple conséquence de l'inversion sexuelle. La température semble agir sur l'expression de l'aromatasase et non sur l'activité de l'aromatasase comme le montrent les dosages réalisés à différentes températures (Tableau 1). Ainsi, chez les Mammifères, les variations de l'activité aromatasase sont corrélées avec les variations du taux d'ARNm de l'aromatasase.

Un choc thermique est capable de diminuer l'activité aromatasase uniquement lorsqu'il est appliqué avant le stade 53. Ceci éclaire la signification biologique de la période thermosensible qui correspondrait ainsi à la

fenêtre d'expression d'un (de) régulateur(s) de l'expression de l'aromatasase.

Cependant, la période thermosensible débute au stade 42, soit bien avant le stade 50 où est détectée l'augmentation de l'activité aromatasase chez les femelles. Ce décalage entre les deux périodes indique que la température agit en amont de l'aromatasase dans la cascade de la détermination sexuelle. La température pourrait aussi agir sur d'autres cibles plus vitales que la différenciation sexuelle, ce qui expliquerait que le traitement thermique soit léthal pour les larves WW qui meurent d'ascite. De même, les thermonéomâles présentent souvent après la métamorphose ou à l'âge adulte des problèmes de régulation hydrique : certains d'entre eux meurent d'oedème généralisé.

Le choc thermique de 48 heures s'est révélé sans effet sur l'activité aromatasase des gonades des larves WW. Peut-être la "quantité" de température n'est elle pas suffisante pour induire un effet chez ces animaux. De nouvelles expériences devront être envisagées en utilisant un choc thermique plus long afin de voir si ces traitements entraînent une baisse de l'activité aromatasase chez des larves WW ou éventuellement la mort de ces animaux.

Effet de l'oestradiol sur la différenciation sexuelle.

Comme chez de nombreuses espèces, l'oestradiol provoque chez le pleurodèle, l'inversion fonctionnelle de mâles génétiques en femelles phénotypiques. Administré à forte

concentration, l'oestradiol n'entraîne aucun effet paradoxal, mise à part l'absence de développement des oviductes. Cette inhibition des oviductes pourrait être due à un effet

toxique des fortes concentrations d'oestradiol ou à une insensibilisation des oviductes par saturation des récepteurs à l'oestradiol. Car le développement des oviductes est bien oestrogène-dépendant : chez le mâle adulte, ce développement peut être induit par un traitement à l'oestradiol.

L'inversion due à l'oestradiol est complète et fonctionnelle, ce qui montre là encore que cette hormone joue un rôle capital dans la différenciation ovarienne. L'oestradiol est également capable d'annuler l'effet masculinisant de la température (Zaborski, 1986).

Lors de l'inversion sexuelle par l'oestradiol, l'augmentation de l'activité aromatasase est relativement tardive puisqu'elle n'apparaît qu'au stade 55, soit plus de trois semaines après le début du traitement, les besoins en oestrogènes de la différenciation

avant ce stade étant sans doute assurés par l'oestradiol exogène. Cependant, tous les génotypes ont la capacité de répondre beaucoup plus rapidement à l'oestradiol. En effet, des traitements de courte durée, à une concentration de 400 µg/l, de larves au stade 53, ont mis en évidence l'existence d'une régulation par feed-back de l'aromatase. La régulation est positive chez les larves ZZ, puisqu'une augmentation de l'activité est observée, et négative chez les larves de génotype femelle ZW et WW, l'oestradiol exogène s'ajoutant vraisemblablement à l'oestradiol endogène pour produire cet effet. On peut cependant s'interroger sur la réalité des doses utilisées par rapport aux concentrations physiologiques existant dans l'animal. Des traitements réalisés sur des cultures de gonades permettraient une étude plus précise du rôle des stéroïdes dans la différenciation sexuelle.

Effet des inhibiteurs d'aromatase.

Le seul inhibiteur d'aromatase efficace chez le pleurodèle, parmi ceux qui ont été testés, est le fadrozole : l'aminogluthetimide est inefficace dans les conditions de traitement utilisées et le miconazole est trop toxique.

Le fadrozole est un inhibiteur qui a entraîné des inversions sexuelles dans de nombreuses espèces. Chez le poulet, des femelles génétiques ont été inversées en mâles capables de produire du sperme (Elbrecht et Smith, 1992). Chez les Reptiles, le fadrozole entraîne le développement de mâles chez la tortue *Trachemys scripta* et le lézard *Cnemidophorus uniparens* (Wibbels et Crews,

1994), chez *Chelydra serpentina* (Rhen et Lang, 1994), et chez *Emys orbicularis* (Dorizzi *et al.*, 1994). Chez *Alligator mississippiensis*, le fadrozole inhibe la différenciation ovarienne mais n'induit pas de masculinisation (Lance et Bogart, 1992). Chez les Poissons, le fadrozole entraîne l'inversion de femelles génétiques en mâles fonctionnels chez le saumon *Oncorhynchus tshawytscha* (Piferrer *et al.*, 1994).

Chez le pleurodèle, le fadrozole administré pendant la période hormonosensible (stade 52 au stade 56) a provoqué la différenciation de testicules chez des femelles

génétiques ZW. Ces testicules ne se distinguent pas morphologiquement des testicules de mâles témoins. L'effet de cet inhibiteur d'aromatase semble tenir du tout ou rien puisque un seul intersexué a été observé et la majorité des femelles n'ont montré aucun signe de masculinisation. Le traitement de larves WW a également conduit au développement de testicules chez un individu WW. L'obtention de mâles WW montre que le chromosome Z n'est pas indispensable à la différenciation mâle et que la principale différence avec le chromosome W ne consiste qu'en la présence sur la partie différentielle du W de gène(s) de la détermination ovarienne. De nouveaux traitements sont en cours pour élever cette fois les animaux jusqu'à l'âge adulte afin de vérifier si l'inversion par le fadrozole est fonctionnelle, notamment pour les animaux WW.

L'évolution de l'activité aromatase a été suivie au cours du traitement au fadrozole. Les dosages montrent que la concentration

d'inhibiteur utilisée est suffisante pour inhiber l'aromatase au début du traitement (stades 52 à 54) mais pas à partir du stade 55. L'activité aromatase et les oestrogènes produits aux stades 55 et 56 auraient donc suffi à induire la différenciation ovarienne chez les larves qui n'ont pas été inversées : chez ces animaux, le fadrozole aurait seulement retardé la différenciation ovarienne. Ces dosages montrent également qu'une activité aromatase élevée est indissociable de la différenciation ovarienne : aux stades 55 et 56, les larves présentant une activité faible ont des testicules (Fig. 23D), et celles présentant une activité aromatase élevée ont des ovaires (Fig. 23E). Le même résultat a été obtenu avec l'inhibiteur letrozole chez la tortue *Emys orbicularis* (Richard-Mercier *et al.*, 1995). Il est intéressant de noter que la différenciation ovarienne a pu se réaliser chez des larves traitées au fadrozole, avec une activité aromatase bien inférieure à celle observée chez les larves ZW non traitées.

Effet de la dihydrotestostérone.

Nos travaux ont démontré la possibilité d'inverser chez le pleurodèle, des femelles génotypiques par un androgène non aromatisable, la dihydrotestostérone. Les travaux de Gallien avaient montré que le traitement de mâles génotypiques par la testostérone à une concentration de 600 µg/l engendre un effet paradoxal, c'est à dire la féminisation des mâles (Gallien, 1962). Cet effet paradoxal avait été expliqué par l'aromatation de la testostérone exogène en oestradiol. Ceci semble confirmé par les

traitements réalisés avec la dihydrotestostérone : à la concentration de 500 µg/l, celle-ci n'entraîne aucun effet paradoxal chez des larves ZZ. De même, chez la tortue *Trachemys scripta*, la dihydrotestostérone augmente le pourcentage des mâles à température d'incubation intermédiaire et n'exerce pas d'effet paradoxal à température masculinisante (Wibbels et Crews, 1993). Cependant, la DHT pourrait exercer son effet masculinisant par l'intermédiaire d'une action anti-oestrogénique en se fixant sur les récepteurs de l'oestradiol.

En effet, Stoll *et al.* (1987) ont montré que chez l'embryon de poulet, la DHT agissait sur le développement des canaux de Müller en se fixant sur les récepteurs des oestrogènes.

La dihydrotestostérone engendre aussi l'inversion de femelles WW, mais, comme pour le traitement avec l'inhibiteur d'aromatase, le problème de la fertilité se pose encore : les animaux ont été examinés peu après la métamorphose. Quelques uns ont été conservés pour les élever jusqu'à l'âge adulte afin de déterminer si ces animaux sont capables de se reproduire. De plus, de nouveaux traitements ont été entrepris en

utilisant une concentration de dihydrotestostérone plus faible. En effet, la concentration de 500 µg/l est peut-être toxique : tous les testicules observés en coupe histologique après le traitement, y compris ceux des animaux ZZ, présentaient très peu de cellules germinales. Cet effet peut être dû à une toxicité de la dihydrotestostérone ou à une prolifération différente des cellules germinales lors de la différenciation testiculaire. En effet, une diminution du nombre de cellules germinales au cours de l'inversion sexuelle a aussi été observée sous l'effet de la température (Dournon *et al.*, 1990).

DISCUSSION

Chez les Mammifères, le développement des crêtes génitales en gonades indifférenciées (premier niveau de régulation) nécessite l'intervention de deux gènes, WT1 (Wilm's Tumour 1) codant pour une protéine à doigt de zinc et SF1 codant pour un récepteur hormonal nucléaire. WT1 fut isolé à l'origine comme un oncogène intervenant dans le cancer du rein chez l'enfant (tumeur de Wilm) (Call *et al.*, 1990). Des souris transgéniques homozygotes pour une mutation de WT1 présentent pendant la période embryonnaire une dégénérescence des gonades et pas de développement des reins, soit un phénotype semblable à celui des souris portant une

mutation de SF1 (Kreidberg *et al.*, 1993). La différenciation est ensuite orientée vers la voie testiculaire par l'intervention de SRY et SOX9, SOX9 permettant la mobilisation des cellules mésenchymateuses du mésonéphros indispensables à l'édification du testicule (Foster *et al.*, 1994), et SRY initiant la différenciation des cellules de Sertoli et la formation des cordons testiculaires. La différenciation ovarienne est enclenchée par l'action du gène dosage-dépendant DAX1. L'expression de DAX1 ne semble pas être inhibée par SRY, étant donné les niveaux d'expression similaires de DAX1 dans les embryons XX et XY entre 10,5 et 11,5 j.p.c.

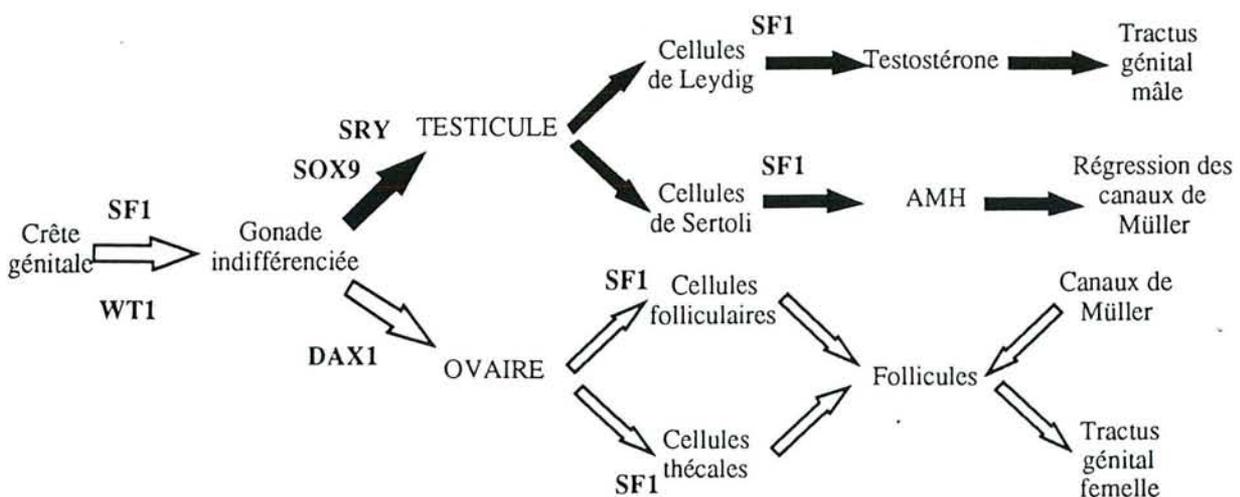


Fig. 26 : Détermination du sexe chez les Mammifères.
(d'après Ramkissoon et Goodfellow, 1996)

En revanche, Burris *et al.* (1995) ont découvert un site de liaison de SF1 dans le promoteur de DAX1. Les cibles des trois gènes SRY, SOX9 et DAX1 ne sont pas encore connues. Des études ont montré que SRY active l'expression de l'AMH de façon indirecte (Haqq *et al.*, 1994). SF1 active ensuite l'expression des gènes des enzymes de la stéroïdogénèse dans le testicule au niveau des cellules de Leydig et dans l'ovaire au niveau des cellules de la granulosa. L'expression de l'AMH par les cellules de Sertoli initiée par SRY est maintenue également par SF1 (Fig. 26).

Aucun des gènes de la détermination sexuelle chez les Mammifères n'est connu chez les Vertébrés non-mammaliens. La découverte de SRY a donné suite à de nombreuses recherches de gènes analogues chez les Vertébrés inférieurs. Ces recherches ont abouti à l'isolement de séquences Sox, mais chez aucune espèce, une séquence liée au sexe n'a été découverte. Néanmoins, la découverte de séquences Sox impliquées dans la détermination sexuelle nécessite l'étude de leur profil d'expression ; or, très peu de séquences Sox ont été étudiées en dehors de celles de l'homme et de la souris. De plus, le gène SRY des Mammifères constitue à lui seul une sous-famille à l'intérieur des gènes Sox (Fig. 1) et évolue très rapidement à cause de sa position sur le chromosome Y (Tucker et Lundrigan, 1993). Ainsi, un gène analogue à SRY chez les Vertébrés non-mammaliens pourrait en être relativement éloigné et avoir échappé aux techniques de clonage par PCR.

Chez l'alligator, Johnston *et al.* (1995) ont détecté une activité Sox dans les gonades en développement d'embryons incubés à

température masculinisante. Des extraits protéiques de crêtes génitales d'embryons d'alligator incubés à température masculinisante ou à température féminisante sont incubés avec un fragment d'ADN marqué contenant la séquence consensus de fixation des protéines Sox (A/T A/T C A A G). L'analyse par électrophorèse des complexes nucléoprotéiques formés montre la présence d'une bande spécifique des gonades mâles en développement. Le même résultat a été obtenu chez le lézard *Eublepharis macularius* qui présente le même type de réponse à la température que l'alligator. L'identification des protéines impliquées dans cette activité de liaison à l'ADN permettra de préciser leur rôle éventuel dans la détermination sexuelle.

Chez les Mammifères, SF1 est l'homologue de FTZ-F1 (fushitarazu factor1) chez la drosophile, et régule l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse. La conservation de SF1 entre les Mammifères et la drosophile et son rôle ubiquitaire laissent présager l'existence de gènes homologues chez les Vertébrés inférieurs.

Des gènes homologues de DAX1 liés au chromosome X ont été détectés chez plusieurs espèces de Mammifères. De même, une séquence homologue existe chez le poulet mais rien n'a été détecté chez la drosophile (Zanaria *et al.*, 1994).

Chez le pleurodèle, il n'existe pas d'effet anti-müllerien : les canaux de Müller ne se développent pas mais persistent jusqu'à l'âge adulte chez le mâle, leur développement reste inductible par un traitement à l'oestradiol chez l'adulte. Chez les autres Amphibiens, l'évolution des canaux de Müller est variable selon les espèces : ils peuvent persister ou régresser partiellement ou totalement. Ainsi, la

présence chez les Amphibiens, d'une protéine semblable à l'AMH mais sans activité anti-müllérienne reste envisageable. Chez les Reptiles, l'activité aromatase semble sensible à l'AMH hétérosécificque : un extrait d'AMH de testicules de boeuf réduit l'activité aromatase dans des cultures d'ovaires foetaux de rat et de

tortue (di Clemente *et al.*, 1992). De même, sur des cultures d'ovaires foetaux de mouton, l'AMH bovine inhibe l'aromatase et provoque la sécrétion de testostérone à la place de l'oestradiol (Vigier *et al.*, 1989). L'AMH pourrait constituer chez les Vertébrés inférieurs un initiateur de la différenciation testiculaire.

* *Action de la température sur la détermination sexuelle.*

- Modèles d'action de la température.

Tous ces gènes de la détermination sexuelle chez les Mammifères pourraient constituer, s'ils existent chez les Vertébrés avec TSD, autant de cibles potentielles de l'action de la température. Néanmoins, il semble peu plausible que la température agisse sur n'importe quelle protéine de la cascade de la détermination sexuelle, car cette protéine devrait permettre à la fois la production d'un sexe à une température et de l'autre sexe à une autre température tout en permettant la production des deux sexes à la température intermédiaire. De plus, cette protéine thermosensible devrait intervenir très tôt dans la détermination sexuelle pour provoquer une inversion complète et fonctionnelle.

Le passage d'un système génétique à un système déterminé par la température est donc sûrement plus complexe que l'intervention d'une seule protéine thermosensible, au moins chez les Reptiles qui présentent une réponse complexe à la température. En revanche, ce modèle pourrait s'appliquer au pleurodèle chez qui la température ne fait que s'ajouter à un système de détermination génétique du sexe qui préexiste à température ambiante. Cependant, ce modèle d'action de la

température sur une protéine thermosensible initiant la cascade de détermination sexuelle doit expliquer les effets contraires de la température chez *P. waltl* et *P. poireti* (Dournon *et al.*, 1984).

Johnston *et al.* (1995) ont proposé plusieurs mécanismes d'action de la température :

- changement de conformation d'une protéine thermosensible.

La température affecte l'activité d'une protéine qui active la différenciation mâle ou réprime la différenciation femelle. Chez les espèces avec un mode de déterminisme Femelle-Mâle-Femelle (FMF), ce changement de conformation de la protéine doit se produire deux fois, aux deux températures de transition : les auteurs expliquent cela par une conformation optimale de la protéine à température optimale masculinisante et un développement femelle aux températures sub-optimales. De plus, si la même protéine est impliquée chez toutes les espèces avec TSD, les mêmes températures devraient engendrer les mêmes changements de conformation et les

mêmes cascades de détermination : en fait, des différences de séquence de la protéine entre les espèces pourraient entraîner des variations de la zone de température à laquelle l'activité de la protéine est optimale.

Cette hypothèse, plausible chez les Reptiles, explique mal chez le pleurodèle les effets opposés de la même température chez deux espèces très proches.

- production thermosensible de facteurs sexualisants jusqu'à un seuil critique.

Le développement testiculaire dépend de la production et de l'accumulation d'un facteur masculinisant pendant une période critique du développement. La température agit directement sur l'accumulation de ce facteur qui, lorsqu'il atteint un seuil critique, provoque la différenciation mâle. Cette hypothèse rend le mieux compte de la notion de quantité de température qui semble si importante dans le mécanisme de la TSD. Elle explique également l'occurrence des deux sexes aux températures d'incubation intermédiaires, lorsque la production du facteur masculinisant atteint juste le seuil critique. Suivant les espèces, la température à laquelle le facteur déterminant est produit peut varier, ce qui explique les différences de réponse à la température. Ce mécanisme pourrait également faire intervenir la production et l'accumulation d'un facteur féminisant.

Ainsi, chez *P. waltl*, l'élevage des larves à 32°C provoquerait la production d'un facteur masculinisant qui inhibe l'aromatase et provoque l'inversion des femelles ZW. Chez *P. poireti*, la température entraînerait ici l'accumulation d'un facteur féminisant qui inverse les mâles ZZ.

- asynchronisme thermosensible des migrations et proliférations cellulaires.

Les migrations et proliférations cellulaires pourraient constituer une cible de la température. Cette hypothèse présuppose un décalage entre les développements mâle et femelle. Smith et Joss (1994b) ont suggéré que, chez *Alligator mississippiensis*, intervenait un décalage temporel, dépendant de la température, entre la différenciation des cellules de Sertoli et la détermination ovarienne. Si le nombre de cellules de Sertoli atteint un seuil critique à une période particulière du développement, l'embryon suit une différenciation testiculaire. L'accumulation de cellules de Sertoli représenterait ainsi le facteur masculinisant et la température agirait sur la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs des cellules de Sertoli.

Comme pour l'hypothèse précédente, l'action de la température sur les migrations et proliférations cellulaires doit être biphasique pour expliquer les effets de la température chez les Reptiles avec un mode de déterminisme du sexe FMF.

Chez le pleurodèle, la prolifération des cellules germinales primordiales est différente selon les sexes : le nombre de cellules germinales est plus important chez la femelle que chez le mâle (Dournon *et al.*, 1990b). Un plus grand nombre de cellules germinales semble être une caractéristique du sexe hétérogamétique (Mittwoch, 1983). Lors de l'inversion d'ovaires par la température chez le pleurodèle (Dournon *et al.*, 1990b) ou par l'AMH chez le rat (Vigier *et al.*, 1987), le nombre de cellules germinales est diminué par rapport aux ovaires normaux. En outre, chez le

pleurodèle, la période P_0 (qui correspond à une absence de prolifération des cellules germinales) se termine au stade 42 chez le mâle alors qu'elle s'achève au stade 45 chez les femelles (Dournon *et al.*, 1990b). Ce décalage entre les différenciations mâle et femelle représente une durée de huit jours et se situe au début de la période thermosensible.

- Action de la température chez le pleurodèle.

Les effets de la température chez le pleurodèle et chez les Reptiles présentent des caractères communs :

- la détermination du sexe est sensible à la température pendant une période précise dénommée la période thermosensible.

- cette période correspond à la période de différenciation gonadique.

- la température agit quantitativement : la détermination sexuelle est sensible à la fois à la durée et à l'amplitude de la température.

- l'application de stéroïdes exogènes annule les effets de la température.

En revanche, chez le pleurodèle, la température n'inverse qu'un seul sexe en se superposant à la détermination génétique. La même réponse est observée chez les Poissons. Chez les Reptiles avec TSD, la détermination sexuelle est due uniquement à la température, mais il pourrait exister un composant génétique de la détermination sexuelle qui fonctionnerait aux températures de transition, comme il l'a été suggéré pour *Emys orbicularis* (Girondot *et al.*, 1994).

L'action de la température sur la détermination sexuelle pourrait être beaucoup plus répandue chez les Vertébrés inférieurs : peu d'espèces ont été étudiées en détail. Ces recherches représentent de longues investigations et nécessitent la maîtrise de la reproduction et du développement de l'espèce étudiée.

Chez le pleurodèle, la température pourrait exercer un effet plus général que l'action sur la détermination sexuelle, ce qui expliquerait que l'élevage à 32°C soit léthal pour les larves WW.

La température induit au niveau des chromosomes en écouvillon d'ovocyte de pleurodèle le développement de boucles constituant des marqueurs chromosomiques. Les chromosomes sexuels mitotiques Z et W ne peuvent être distingués. En revanche, un choc thermique de 3 heures à 36°C provoque l'apparition de boucles différentes sur chacun des chromosomes sexuels. Ces boucles permettent d'identifier les chromosomes Z et W et délimitent une zone hétéromorphe au niveau de la partie médiane des chromosomes sexuels (Lacroix *et al.*, 1990). La formation de boucles au niveau des chromosomes en écouvillon est corrélée avec une variation de l'activité transcriptionnelle du chromosome.

L'obtention de mâles WW montre que la partie spécifique du chromosome Z n'est pas indispensable à la différenciation mâle. De même, la possibilité d'inverser des animaux ZZ en femelles fertiles démontre que le chromosome W n'est pas nécessaire pour la différenciation femelle. Cependant, Lacroix *et*

al. (1990) ont identifié une femelle trisomique ZZW fertile, ce qui montre que le chromosome W intervient dans la détermination sexuelle femelle.

D'autres arguments sont en faveur d'une action de la température sur des gènes de la détermination sexuelle situés sur les chromosomes sexuels chez le pleurodèle. Dorazi *et al.* (1995) ont proposé l'existence d'une séquence activée par la température au voisinage du gène β de la peptidase sur les

chromosomes sexuels (locus thermosensible TS, figure 27). Cette séquence agirait comme un inhibiteur des gènes de la détermination situés en *cis*. En effet, chez *Pleurodeles poireti*, au contraire de *Pleurodeles waltil*, le gène β de la peptidase est lié au chromosome Z et le gène A au chromosome W. Ainsi, l'inversion sexuelle, c'est à dire l'inhibition des déterminants ovariens ou testiculaires situés sur les chromosomes sexuels, semble liée à la présence du gène β de la peptidase.

* Rôle des stéroïdes sexuels.

L'intervention des stéroïdes dans la détermination sexuelle a été démontrée dans de nombreuses espèces. Chez le pleurodèle, les résultats exposés précédemment confirment l'importance du rôle des stéroïdes initialement suggéré par les travaux de Gallien (1951, 1954, 1962) :

- le traitement de mâles génétiques ZZ par le benzoate d'oestradiol pendant la période larvaire provoque le développement de femelles.

- la capacité de synthèse des oestrogènes par les gonades en cours de

différenciation est beaucoup plus importante chez les femelles que chez les mâles : la différenciation ovarienne est associée à une forte activité aromatasase.

- cette capacité de synthèse apparaît avant la différenciation histologique du sexe des gonades.

- un inhibiteur de l'aromatase provoque l'inversion sexuelle des femelles génétiques.

- un androgène non aromatisable, la dihydrotestostérone (DHT) provoque l'inversion sexuelle des femelles génétiques.

- Rôle des stéroïdes sexuels et détermination génétique.

Chez les Reptiles avec TSD, la testostérone exerce un effet paradoxal et provoque la différenciation d'embryons femelles. Il existe cependant chez les Reptiles, une espèce dont la différenciation gonadique est inversée par la testostérone : chez cette espèce, la température et l'oestradiol n'ont pas d'effet (Ganesh et Raman, 1995). Existe-t il comme chez les Amphibiens, une relation entre

l'effet des stéroïdes sexuels et le système de déterminisme génétique du sexe? Chez les Amphibiens, l'hormone du sexe hétérogamétique inverse les individus du sexe homogamétique (Gallien, 1962) : ce dernier constituerait le "sexe de base" et l'hétérochromosome provoquerait la différenciation mâle chez les XY ou femelle chez les ZW en activant la synthèse des

stéroïdes sexuels correspondants. Une situation analogue pourrait exister chez les Reptiles avec TSD : la différenciation testiculaire serait constitutive et la température activerait la synthèse d'oestrogènes à température féminisante. La différenciation ovarienne nécessiterait ainsi l'inhibition de la différenciation testiculaire grâce à un haut niveau d'oestrogènes (Pieau, 1996).

Chez le pleurodèle, le(s) gène(s) de la détermination ovarienne du chromosome W induit la synthèse d'oestrogènes et une boucle de rétroaction positive se met ensuite en place, ce qui explique les résultats obtenus lors de traitements à l'oestradiol et l'augmentation exponentielle de l'activité aromatase lors de la différenciation femelle. De plus, chez le mâle, l'expression du récepteur des oestrogènes semble constitutive (comme le serait celle du récepteur des androgènes chez les amphibiens XX) ce qui permet l'inversion sexuelle par un traitement à l'oestradiol.

Dans cette hypothèse, le rôle de l'aromatase est primordial : en effet, la simple

inhibition de l'activité de cette enzyme provoque l'inversion sexuelle chez le pleurodèle, comme chez d'autres espèces de poissons, d'amphibiens, de reptiles et d'oiseaux.

Une autre hypothèse sur le rôle des stéroïdes dans la détermination sexuelle accorde une place de pivot à la testostérone métabolisée en oestradiol ou en DHT (Wibbels et Crews, 1994). Les développements mâle et femelle constitueraient deux voies parallèles de différenciation et la 5 α réductase jouerait le même rôle que l'aromatase. En effet, chez la tortue *Trachemys scripta*, la DHT entraîne la différenciation mâle (Wibbels et Crews, 1993), et un inhibiteur de la 5 α réductase, la différenciation femelle (Crews et Bergeron, 1994). En revanche, ces effets n'ont pu être mis en évidence qu'à température d'incubation intermédiaire.

Chez le pleurodèle, la DHT inverse les femelles génétiques mais son efficacité semble moins forte que celle de l'oestradiol. Cet effet pourrait être dû à une compétition avec l'oestradiol au niveau du récepteur des oestrogènes (Stoll *et al.*, 1987).

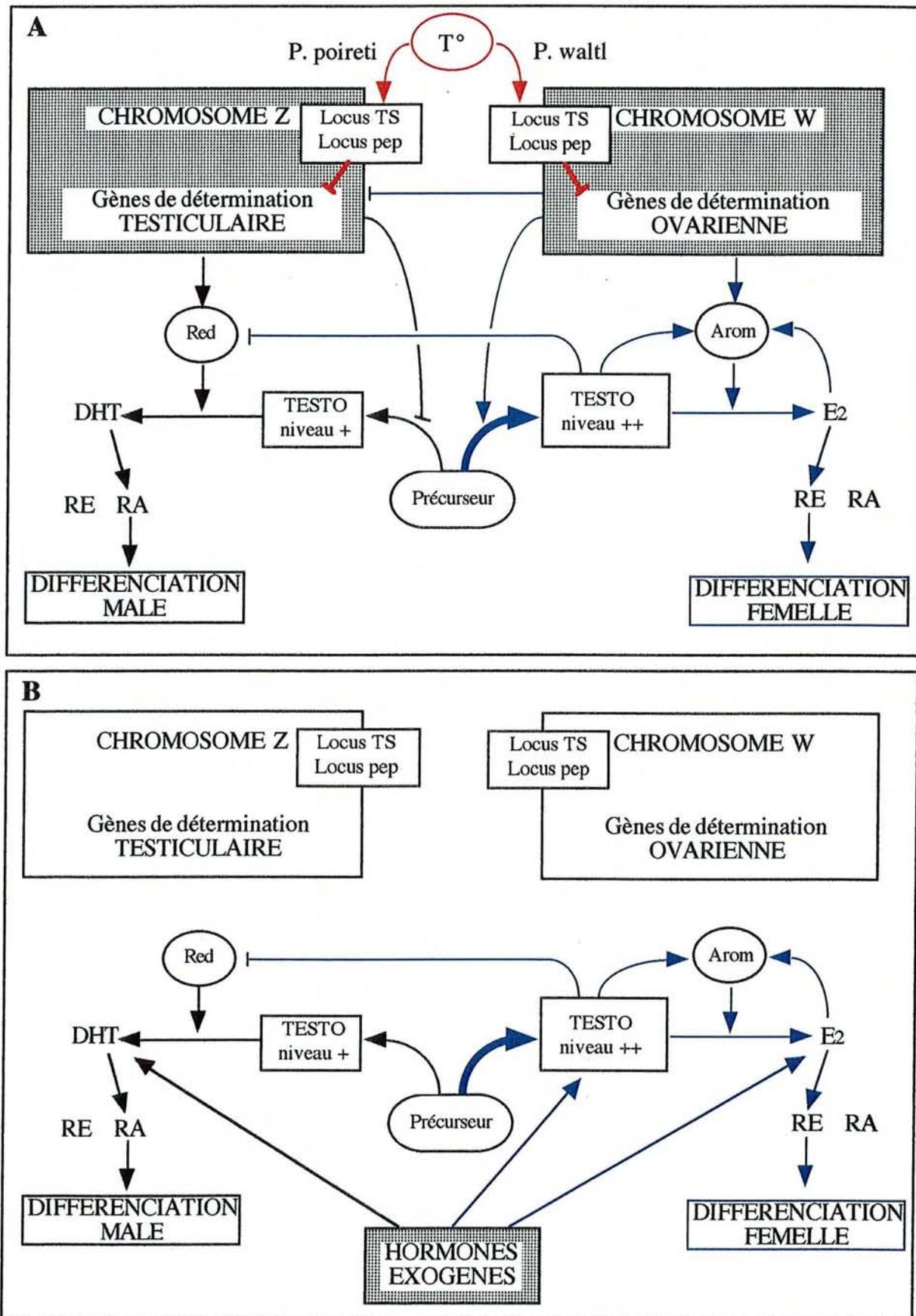
- Rôle des stéroïdes et effets de la température.

De nombreuses études ont démontré chez les Reptiles la corrélation entre les actions de la température et des stéroïdes sur la détermination sexuelle. La température agit notamment sur l'expression de l'aromatase et modifie l'environnement stéroïdien de l'embryon (Pieau *et al.*, 1994b).

La température pourrait agir par trois mécanismes différents (Pieau, 1996) : la température régule un facteur thermosensible qui directement ou indirectement, active (i), ou

réprime (ii) la transcription de l'aromatase, ou la température régule l'expression de protéines de choc thermique impliquées dans la liaison des oestrogènes à leur récepteur (iii).

Chez *P. waltl*, la température inhibe l'activité aromatase pendant la période thermosensible. Cependant, la période thermosensible débute au stade 42 et la différence significative entre activités aromatase mâle et femelle n'apparaît qu'au stade 51-52 (à moins qu'une différence non



détectée par la technique utilisée n'existe aux stades précédents). Cet important décalage suggère que la température n'agit pas directement sur l'aromatase mais sur un autre facteur régulant l'aromatase. Ainsi, la température, en inhibant l'aromatase, inhibe la différenciation ovarienne et permet la différenciation testiculaire.

Chez *P. poireti*, le même mécanisme d'action de la température doit être observé : chez cette espèce, la température n'inhibe plus l'aromatase mais un (ou des) gène(s) de la détermination testiculaire (qui pourrait réguler la 5 α réductase). Chez le pleurodèle, la larve peut suivre ainsi l'une ou l'autre des deux voies parallèles de la différenciation sexuelle.

La figure 27 présente une hypothèse du mécanisme de la détermination sexuelle chez le pleurodèle. Les chromosomes sexuels Z et W activent l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse, ce qui détermine chez les mâles une faible concentration de testostérone et la synthèse de DHT, et chez les femelles une forte concentration de testostérone et la synthèse d'oestradiol (Fig. 27A). La température agit sur les gènes de détermination des chromosomes Z chez *P. poireti*, et du chromosome W chez *P. waltl* par l'intermédiaire d'un locus thermosensible associé physiquement au locus du gène β de la peptidase. Les hormones exogènes se substituent à l'action des chromosomes sexuels et activent directement les mécanismes de différenciation mâle ou femelle (Fig. 27B).

De nombreux travaux restent encore à entreprendre pour infirmer ou confirmer ces hypothèses :

- Tout d'abord, la recherche de gènes de la détermination sexuelle, homologues ou non de gènes des Mammifères, est à poursuivre.

Le test de l'AMH sur des cultures organotypiques de gonades permettrait de déterminer s'il existe chez le pleurodèle une activité AMH anti-aromatase.

Une collaboration va être engagée avec D. Guerrier de l'INSERM U435 de Rennes afin de rechercher des gènes exprimés différemment dans les gonades de pleurodèle au cours de la différenciation sexuelle.

- La recherche des ADNc de l'aromatase et du récepteur des oestrogènes est également à poursuivre. L'isolement de ces séquences permettra une étude plus précise des stades précoces de la différenciation sexuelle, et de la régulation de l'expression de ces gènes.

- Le traitement de larves par un inhibiteur de la 5 α réductase permettra de préciser l'action de la dihydrotestostérone sur la différenciation sexuelle (action par l'intermédiaire du récepteur des androgènes ou du récepteur des oestrogènes).

- Enfin, l'étude de la différenciation sexuelle de larves de *Pleurodeles poireti* apporterait également de nombreuses réponses. Malheureusement, cette espèce est beaucoup plus difficile à élever en laboratoire que *Pleurodeles waltl*.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackerman, G.E., Smith, M.E., Mendelson, C.R., MacDonald, P.C. et Simpson, E.R. (1981). Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53** : 412-417.
- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., Worley, K., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, R.R.B., Fraccaro, M., Zuffardi, O. et Camerino, G. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. Genet.* **7** : 497-501.
- Baroiller, J.F. (1988). Etude corrélée de l'apparition des critères morphologiques de la différenciation de la gonade et de ses potentialités stéroïdogènes chez *Oreochromis niloticus*. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6 (France) 70p.
- Baroiller, J.F., Chourrout, D., Fostier, A. et Jalabert, B. (1995). Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbreeding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* **273** : 216-223.
- Berhinger, R.R., Cate, R.L., Froelick, G.J., Palmiter, R.D. et Brinster, R.L. (1990). Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature* **345** : 167-170.
- Berhinger, R.R., Finegold, M.J. et Cate, R.L. (1994). Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* **79** : 415-425.
- Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N. et Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis determining factor. *Nature* **348** : 448-450.
- Bhatnagar, A.S., Hausler, A., Schieweck, K., Lang, M. et Bowman, R. (1990). Highly selective inhibition of estrogen synthesis by CGS 20267, a new non-steroidal aromatase inhibitor. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **37** : 1021-1027.
- Bogart, M.H. (1987). Sex determination : a hypothesis based on steroid ratios. *J. Theoret. Biol.* **128** : 349-357.

- Bull, J.J. (1980). Sex determination in reptiles. *Quart. Rev. Biol.* **55** : 3-21.
- Bull, J.J. (1987). Temperature sensitive periods of sex determination in a lizard : comparisons with turtles and crocodiles. *J. Exp. Zool.* **241** : 143-148.
- Bull, J.J. et Vogt, R.C. (1981). Temperature sensitive periods of sex determination in emydid turtles. *J. Exp. Zool.* **218** : 435-440.
- Bull, J.J., Gutzke, W.H.N. et Crews, D. (1988). Sex reversal in three reptilian orders. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70** : 425-428.
- Burns, R.K. (1938). The effects of crystalline sex hormones on sex differentiation in *Ambystoma*. I. Estrone. *Anat. Record* **113** : Abst 564.
- Burns, R.K. (1955). Experimental sex reversal of sex in the gonads of the opossum *Didelphis virginiana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **41** : 669-676.
- Burns, R.K. (1961). Role of hormones in the differentiation of sex. In *Sex and Internal Secretions*, vol1 pp76-156. Ed W.C. Young. Baltimore : Williams and Wilkins.
- Burris, T.P., Guo, W., Le, T., McCabe, E.R.B. (1995). Identification of a putative steroidogenic factor 1 response element in the DAX1 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214** : 576-581.
- Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeger, H., Lawlis, W.H. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilm's tumour locus. *Cell* **60** : 509-520.
- Capel, B., Swain, A., Nicolis, S., Hacker, A., Walter, M., Koopman, P., Goodfellow, P. et Lovell-Badge, R. (1993). Circular transcripts of the testis determining gene Sry in the adult testis. *Cell* **73** : 1019-1030.
- Cate, R.L., Mattaliano, R.J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N.M., Cheung, A., Ninfa, E.G., Frey, A.Z., Gash, D.J., Chow, E.P., Fisher, R.A., Bertonis, J.M., Torres, G., Wallner, B.P., Ramachandran, K.L., Ragin, R.C., Manganaro, T.F., MacLaughlin, D.T. et Donahoe, P.K. (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.
- Charnier, M. (1966). Action de la température sur la sex ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lacertilien). *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **160** : 620-622.
- Collenot, A. (1961). Inversion expérimentale du sexe chez les mâles génétiques de l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. par le diéthylstilboestrol. *C. R. Acad. Sci. Paris* **253** : 2603-2605.

- Collenot, A. (1965). L'activité $\Delta 5$ - 3β -hydroxystéroïde déshydrogénasique dans le testicule de *Pleurodeles waltlii* au cours de l'ontogénèse. *Gen. Comp. Endocrinol.* **5** : 669-670.
- 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. et Collenot, A. (1977). L'activité 3β -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. Morph.* **42** : 29-42.
- Connor, F., Wright, E., Denny, P., Koopman, P. et Ashworth, A. (1995). The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res.* **23** : 3365-3372.
- Conover, D.O. et Kynard, B.E. (1981). Environmental sex determination : interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* **213** : 577-579.
- Coriat, A.M., Müller, U., Harry, J.L., Uwanogho, D. et Sharpe, P.T. (1993). PCR amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the SRY-box motif. *PCR Meth. Appl.* **2** : 218-222.
- Cousin, M., Gerber, M., Burger, G., Boisseau, C. et Chevassus, B. (1989). Effect of methyltestosterone on sex differentiation and gonad morphogenesis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Living Resour.* **2** : 225-230.
- Cree, A., Thompson, M.B. et Daugherty, C.H. (1995). Tuatara sex determination. *Nature* **375** : 543.
- Crews, D. et Bergeron, J.M. (1994). Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature dependent sex determination. *J. Endocrinol.* **143** : 279-289.
- Crews, D., Wibbels, T. et Gutzke W.H.N. (1989). Action of sex steroid hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **76** : 159-166.
- Crews, D., Bull, J.J. et Wibbels, T. (1991). Estrogen and sex reversal in turtles : a dose dependent phenomenon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **81** : 357-364.
- Crews, D., Bergeron, J.M., Bull, J.J., Flores, D., Tousignant, A., Skipper, J.K. et Wibbels, T. (1994). Temperature dependent sex determination in reptiles : proximate mechanisms, ultimate outcomes and practical applications. *Dev. Genetics* **15** : 297-312.

- Dabovic, B., Zanaria, E., Bardoni, B., Lisa, A., Bordignon, C., Russo, V., Matessi, C., Traversari, C. et Camerino, G. (1995). A family of rapidly evolving genes from the sex reversal critical region in Xp21. *Mammalian Genome* **6** : 571-580.
- Daneau, I., Houde, A., Ethier, J.F., Lussier, J.G. et Silversides, D.W. (1995). Bovine SRY locus : cloning and testicular expression. *Biol. Reprod.* **5235** : 591-599.
- Denny, P., Swift, S., Brand, N., Dabhade, N., Barton, P. et Ashworth, A. (1992a). A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res.* **20** : 2887.
- Denny, P., Swift, S., Connor, F. et Ashworth, A. (1992b). An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence specific DNA-binding protein. *EMBO J.* **11** : 3705-3712.
- Desvages, G. et Pieau, C. (1991). Steroid metabolism in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39** : 203-213.
- Desvages, G. et Pieau, C. (1992a). Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41** : 851-853.
- Desvages, G. et Pieau, C. (1992b). Time required for temperature-induced changes in gonadal aromatase activity and related gonadal structure in turtle embryos. *Differentiation* **52** : 13-18.
- Desvages, G., Girondot, M. et Pieau, C. (1993). Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **92** : 54-61.
- di Clemente, N., Ghaffari, S., Pepinsky, R.B., Pieau, C., Josso, N., Cate, R.L. et Vigier, B. (1992). A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-Müllerian hormone : the fetal ovary aromatase assay. *Development* **114** : 721-727.
- di Clemente, N., Goxe, B., Rémy, J.J., Cate, R.L., Josso, N., Vigier, B. et Salesse, R. (1994a). Effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* **2** : 553-558.
- di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J.Y., Vigier, B., Josso, N. et Cate, R. (1994b). Cloning, expression and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol. Endocrinol.* **8** : 1006-1020.
- Dodson Michael, M., Kilgore, M.W., Morohashi, K.I. et Simpson, E.R. (1995). Ad4BP/SF1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. *J. Biol. Chem.* **270** : 13561-13566.

- Dorazi, R., Chesnel, A. et Dournon, C. (1995). Opposite sex determination of gonads in two pleurodeles species may be due to a temperature-dependent inactivation of sex chromosomes. *J. Hered.* **86** : 28-31.
- Dorizzi, M., Mignot, T.M., Guichard, A., Desvages, G. et Pieau, C. (1991). Involvement of estrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation* **47** : 9-17.
- Dorizzi, M., Richard-Mercier, N., Desvages, G., Girondot, M. et Pieau, C. (1994). Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature dependent sex determination. *Differentiation* **58** : 1-9.
- Dournon, C., Guillet, F., Boucher, D. et Lacroix, J.C. (1984). Cytogenetic and genetic evidence of male sexual inversion by heat treatment in the newt *Pleurodeles poireti*. *Chromosoma* **90** : 261-264.
- Dournon, C., Collenot, A. et Lauthier, M. (1988). Sex-linked peptidase 1 profils 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. Dév.* **28** : 979-987.
- Dournon, C., Houillon, C. et Pieau, C. (1990). Temperature sex reversal in amphibians and reptiles. *Int. J. Dev. Biol.* **34** : 81-92.
- Dournon, C., Durand, D., Demassieux, C. et Lesimple, M. (1990b). Differential germ cell proliferation in the salamander *Pleurodeles waltl* : controls by sexual genotype and by thermal epigenetic factors before differentiation of sexual phenotype of gonads. *Int. J. Dev. Biol.* **34** : 365-375.
- Dournon, C. et Houillon, C. (1984). 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. Dév.* **24** : 361-378.
- Dournon, C. et 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. Dév.* **25** : 671-688.
- Dunn, T.L., Mynett-Johnson, L., Wright, E.M., Hosking, B.M., Koopman, P.M. et Muscat, G.E.O. (1995). Sequence and expression of Sox18 encoding a new HMG-box transcription factor. *Gene* **161** : 223-225.
- Elbrecht, A. et Smith, R.G. (1992). Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* **255** : 467-470.
- Ewert, M.A., Jackson, D.R. et Nelson, C.E. (1994). Patterns of temperature dependent sex determination in turtles. *J. Exp. Zool.* **270** : 3-15.

- Ferguson, M.W.J. et Joanen, T. (1983). Temperature dependent sex determination in the *Alligator mississippiensis*. *J. Zool.* **200** : 143-177.
- Ferrari, S., Harley, V.R., Pontiggia, A., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N. et Bianchi, M.E. (1992). SRY, like HMG1, recognises a sharp angle in DNA. *EMBO J.* **11** : 4497-4506.
- Ferrier, V., Jaylet, A., Cayrol, C., Gasser, F. et Buisan, J.J. (1980). Etude électrophorétique des peptidases érythrocytaires chez *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodele) : mise en évidence d'une liaison avec le sexe. *C. R. Acad. Sc. Paris sér. D* **290** : 571-574.
- Foote, C.L. (1940). Response of gonads and gonoducts of *ambystoma* larvae to treatment with sex hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **43** : 519-523.
- Ford, C.E., Jones, K.W., Polani, P., De Almeida, J.C. et Brigg, J.H. (1959). A sex chromosome anomaly in a case of gonadal sex dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* **i** : 711-713.
- Foster, J.W., Brennan, F.E., Hampikian, G.K., Goodfellow, P.N., Sinclair, A.H., Lovell-Badge, R., Selwood, L., Renfree, M.B., Cooper, D.W. et Marshall-Graves, J.A. (1992). Evolution of sex determination and the Y chromosome : SRY-related sequences in marsupials. *Nature* **359** : 531-533.
- Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., Goodfellow, P.N., Brook, J.D. et Schafer, A.J. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372** : 525-530.
- Foster, J.W. et Marshall-Graves, J.A. (1994). An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome : implications for the evolution of the mammalian testis determining gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** : 1927-1931.
- Gall, J.G. (1954). Lampbrush chromosomes from oocyte nuclei of the newt. *J. Morphol.* **94** : 283-351.
- Gallien, L. (1951). Sur la descendance unisexuée d'une femelle de *Pleurodeles waltlii* Michah. ayant subi pendant sa phase larvaire l'action gynogène du benzoate d'oestradiol. *C. R. Séances Acad. Sci. (Paris) (D)* **233** : 828-830.
- Gallien, L. (1954). Inversion expérimentale du sexe sous l'action des hormones sexuelles chez le triton *Pleurodeles waltlii* Michah. Analyse de conséquences génétiques. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **88** : 1-51.
- Gallien, L. (1962). Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl* : 346-355.

- Gallien, L., et Collenot, A. (1960). Inversion du phénotype sexuel (féminisation) chez *Triturus helveticus* Raz. et *Triturus alpestris* Laur. à la suite d'un traitement gynogène par le benzoate d'oestradiol administré pendant la vie larvaire. *C. R. Acad. Sci.* **250** : 926-928.
- Gallien, L. et Durocher, M. (1957). Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl*. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91** : 97-114.
- Ganesh, S. et Raman, R. (1995). Sex reversal by testosterone and not by estradiol or temperature in *Calotes versicolor*, the lizard lacking sex chromosomes. *J. Exp. Zool.* **271**: 139-144.
- Girondot, M., Zaborski, P., Servan, J. et Pieau, C. (1994). Genetic contribution to sex determination in turtles with environmental sex determination. *Genet. Res.* **63** : 117-127.
- Goodfellow, P.N. et Lovell-Badge, R. (1993). Sry and sex determination in mammals. *Annu. Rev. Genet.* **27** : 71-92.
- Gozé, C., Poulat, F. et Berta, P. (1993). Partial cloning of SOX11 and SOX12, two new human SOX genes. *Nucleic Acids Res.* **21** : 2943.
- Griffiths, R. (1991). The isolation of conserved DNA sequences related to the human sex determining region Y gene from the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). *Proc. R. Soc. Lond. B* **244** : 123-128.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P.N. et 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.
- Gutzke, W.H.N et Bull, J.J. (1986). Steroid hormones reverse sex in turtles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64** : 368-372.
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. et Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* **121** : 1603-1614.
- Hanaoka, K.I. (1941). The effect of follicular hormone upon sex differentiation in *Hynobius retardatus*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. VI* **7** : 413-419.
- Haqq, C.M., King, C.Y., Donahoe, P. et Weiss, M.A. (1993). SRY recognises conserved DNA sites in sex specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 1097-1101.
- Haqq, C.M., King, C.Y., Ukiyama, E., Falsafi, S., Haqq, T.N., Donahoe, P.K. et Weiss, M.A. (1994). Molecular basis of mammalian sexual determination : activation of müllerian inhibiting substance gene expression. *Science* **266** : 1494-1500.

- Harley, V.R., Jackson, D.I., Hextall, P., Hawkins, J.R., Berkovitz, G.D., Sockanathan, S., Lovell-Badge, R. et Goodfellow, P.N. (1992). DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* **255** : 453-456.
- Harley, V.R., Lovell-Badge, R. et Goodfellow, P.N. (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res.* **22** : 1500-1501.
- Hawkins, J.R. (1993). Mutational analysis of SRY in XY females. *Human Mutation* **2** : 347-350.
- Hostache, G., Pascal, M. et Teissier, C. (1995). Influence de la température d'incubation sur le rapport mâle:femelle chez l'atipa, *Hoplosternum littorale*. *Can. J. Zool.* **73** : 1239-1246.
- Hunter, G.A. et Donaldson, E.M. (1983). Hormonal sex control and its application to fish culture. In *Fish Physiology*, pp 223-303. Eds W.S. Hoar, D.J. Randall et E.M. Donaldson. New York : Academic Press.
- Hsü, C.Y., Yü, N.W. et Liang, H.M. (1971). Induction of sex reversal in female tadpoles of *Rana catesbeiana* by temperature treatment. *Endocrinol. Jpn.* **18** : 243-251.
- Ikeda, Y., Lala, D.S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M.P. et Parker, K.L. (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* **7** : 852-860.
- Ikeda, Y., Shen, W.H., Ingraham, H.A. et Parker, K.L. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* **8** : 654-662.
- Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J.H. et Parker, K.L. (1995). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* **9** : 478-486.
- Imbeaud, S., Carré-Eusebe, D., Rey, R., Belville, C., Josso, N. et Picard, J.Y. (1994). Molecular genetics of the persistent Müllerian duct syndrome : a study of 19 Families. *Hum. Mol. Genet.* **3** : 125-131.
- Ingraham, H.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W.H., Nachtigal, M.W., Abbud, R., Nilson, J.H. et Parker, K.L. (1994). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* **8** : 2302-2312.
- Ito, M., Ishikawa, M., Suzuki, S., Takamatsu, N. et Shiba, T. (1995). A rainbow trout SRY-type gene expressed in pituitary glands. *FEBS Letters* **377** : 37-40.

- Jacobs, P.A. et Strong, J.A. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature* **183** : 302-303.
- Jäger, R.J., Anvret, M., Hall, K. et Scherer, G. (1990). A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis determining gene SRY. *Nature* **348** : 452-454.
- Janzen, F. et Paukstis, G.L. (1991). Environmental sex determination in reptiles : ecology, evolution and experimental design. *Quart. Rev. Biol.* **66** : 149-179.
- Jay, P., Gozé, C., Marsollier, C., Taviaux, S., Hardelin, J.P., Koopman, P. et Berta, P. (1995). The human SOX11 gene : cloning, chromosomal assignment and tissue expression. *Genomics* **29** : 541-545.
- Jeyasuria, P., Roosenburg, W.M. et Place A.R. (1994). Role of P450 aromatase in sex determination of the diamondback terrapin, *Malaclemys terrapin*. *J. Exp. Zool.* **207** : 95-111.
- Johnston, C.M., Barnett, M. et Sharpe, P.T. (1995). The molecular biology of temperature-dependent sex determination. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **350** : 297-304.
- Joss, J.M.P. (1989). Gonadal development and differentiation in *Alligator mississippiensis* at male and female producing incubation temperatures. *J. Zool.* **218** : 679-687.
- Jost, A. (1947). Recherches sur la différenciation de l'embryon de lapin. *Arch. Microsc. Morphol. Exp.* **36** : 271-315.
- Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology : the gonadal and hypophysical hormones. *Rec. Prog. Hormone Res.* **8** : 379-413.
- Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R. et Kondoh, H. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J.* **14** : 3510-3519.
- Knebelmann, B., Boussin, L., Guerrier, L., Legeai, L., Kahn, A., Josso, N. et Picard, J.Y. (1991). Anti-Müllerian hormone Bruxelles : a non-sense mutation associated with the persistent Müllerian duct syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** : 3767-3771.
- Koopman, P., Gubbay, J., Collignon, J. et Lovell-Badge, R. (1989). Zfy gene expression is not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* **342** : 940-942.
- Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. et Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* **248** : 450-452.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P.N. et Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351** : 117-121.

- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. et Jaenisch, R. (1993). WT1 is required for early kidney development. *Cell* **74** : 679-691.
- Lacroix, J.C., Azzouz, R., Simon, F., Bellini, M., Charlemagne, J. et Dournon, C. (1990). Lampbrush W and Z heterochromosome characterization with monoclonal antibody and heat-induced chromosomal markers in the newt *pleurodeles waltl* : W chromosome plays a role in female sex determination. *Chromosoma* **99** : 307-314.
- Lala, D.S., Rice, D.A. et Parker, K.L. (1992). Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzymes expression, is the mouse homolog of fushi tarazu factor 1. *Mol. Endocrinol.* **6** : 1249-1258.
- Lance, V.A. et Bogart, M.H. (1991). Tamoxifen "sex reverses" alligator embryos at male producing temperature, but is an antiestrogen in female hatchlings. *Experimentia* **47** : 263-266.
- Lance, V.A. et Bogart, M.H. (1992). Disruption of ovarian development in alligator embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86** : 59-71.
- Lang, J.W. et Andrews, H. (1994). Temperature dependent sex determination in crocodylians. *J. Exp. Zool.* **270** : 28-44.
- Layfield, R., Mynett-Johnson, L., Yarwood, P.J., Muscat, G.E.O., Koopman, P. et Hume, D.A. (1994). EMBL L29084.
- Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S. et Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90** : 11162-11166.
- Luo, X., Ikeda, Y. et Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77** : 481-490.
- Lynch, J.P., Lala, D.S., Peluso, J.J., Luo, W., Parker, K.L. et White, B. (1993). Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol. Endocrinol.* **7** : 776-786.
- McElreavey, K., Vilain, E., Abbas, N., Costa, J.M., Souleyreau, N., Kucheria, K., Boucekkine, C., Thibaud, E., Brauner, R., Flamant, F. et Fellous, M. (1992). XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis determining region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 11016-11020.
- Mardon, G., Mosher, R., Disteche, C.M., Nishioka, Y.U., McLaren, A. et Page, D.C. (1989). Duplication, deletion and polymorphism in the sex determining region of the mouse Y chromosome. *Science* **243** : 78-80.
- Mason, J.I., Murry, B.A., Olcott, M. et Sheets, J.J. (1985). Imidazole antimycotics : inhibitors of steroid aromatase. *Biochem. Pharmacol.* **34** : 1087-1092.

- Merchant-Larios, H., Fierro, I.V. et Urruiza, B.C. (1989). Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herp. Monogr.* **1989** : 43-61.
- Meyer, J., Wirth, W., Held, M., Schempp, W. et Scherer, G. (1996). SOX20, a new member of the SOX gene family, is located on chromosome 17p13. *Cytogenet. Cell Genet.* **72** : 246-249.
- Miller, W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Rev.* **9** : 295-318.
- Mittwoch, U. (1983). Heterogametic sex chromosomes and the development of the dominant gonad in vertebrates. *Am. Nat.* **122** : 159-180.
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A. et Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet.* **14** : 62-68.
- Münsterberg, A. et Lovell-Badge, R. (1991). Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* **113** : 613-624.
- Muscatelli, F., Strom, T.M., Walker, A.P., Zanaria, E., Recan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl, W., Schwarz, H.P., Kaplan, J.C., Camerino, G., Meitinger, T. et Monaco, A.P. (1994). Mutations in the DAX1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotrophic hypogonadism. *Nature* **373** : 672-676.
- Muscatelli, F., Walker, A.P., De Plaen, E., Stafford, A.N. et Monaco, A.P. (1995). Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** : 4987-4991.
- Ogata, T., Hawkins, J.R., Taylor, A., Matsuo, N., Hata, J. et Goodfellow, P.N. (1992). Sex reversal in a child with a 46,XYp+ karyotype : support for the existence of gene(s) located in distal Xp, involved in testis formation. *J. Med. Genet.* **29** : 226-230.
- Page, D.C., Mosher, R., Simpson, E., Fisher, E., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., de la Chapelle, A. et Brown, L. (1987). The sex determining region of the Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* **51** : 1091-1104.
- Palmer, M.S., Sinclair, A.H., Berta, P., Ellis, N., Goodfellow, P.N., Abbas, N.E. et Fellous, M. (1989). Genetic evidence that ZFY is not the testis determining factor. *Nature* **342** : 937-939.

- Pang, S., Yang, X., Wang, M., Tissot, R., Nino, M., Manaligod, J., Bullock, L.P. et Mason, J.I. (1992). Inherited congenital adrenal hyperplasia in the rabbit : absent cholesterol side chain cleavage enzyme cytochrome P450 gene expression. *Endocrinology* **131** : 181-186.
- Picard, J.Y. et 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. et Kahn, A. (1986). Cloning and expression of cDNA for anti-Müllerian hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83** : 5464-5468.
- Pieau, C. (1970). Effets de l'oestradiol sur l'appareil génital de l'embryon de tortue mauresque (*Testudo graeca* L.). *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* **59** : 295-318.
- Pieau, C. (1973). Variation de l'activité $\Delta 5$ - 3β -hydroxystéroïde déshydrogénasique dans les glandes génitales d'embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien) en fonction de la température d'incubation. *C. R. Acad. Sc. Paris Série D* **277** : 197-200.
- Pieau, C. (1974). Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien) ; effets des hormones sexuelles. *Ann. Embryol. Morphol.* **7** : 365-394.
- Pieau, C. (1996). Temperature variation and sex determination in reptiles. *Bioessays* **18** : 19-26.
- Pieau, C., Mignot, T.M., Dorizzi, M. et Guichard, A. (1982). Gonadal steroid levels in the turtle *Emys orbicularis* L. : a preliminary study in embryos, hatchlings and young as a function of incubation temperature. *Gen. Comp. Endocrinol.* **47** : 392-398.
- Pieau, C., Girondot, M., Desvages, G., Dorizzi, M., Richard-Mercier, N. et Zaborski, P. (1994a). Environmental control of gonadal differentiation. In *The differences between sexes*, pp433-448. Eds R.V. Short et E. Balaban. Cambridge, England : Cambridge University Press.
- Pieau, C., Girondot, M., Richard-Mercier, N., Desvages, G., Dorizzi, M. et Zaborski, P. (1994b). Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the european pond turtle : hormonal involvement. *J. Exp. Zool.* **270** : 86-94.
- Pieau, C. et Dorizzi M. (1981). Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in the embryos of the turtle, *Emys orbicularis*. *J. Morphol.* **170** : 373-382.
- Piferrer, F., Zanuy, S., Carillo, M., Solar, I.I., Devlin, R.H. et Donaldson, E.M. (1994). Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.* **270** : 255-262.

- Piquet, J. (1930). Détermination du sexe chez les Batraciens en fonction de la température. *Rev. Suisse Zool.* **37** : 173-281.
- Pontiggia, A., Rimini, R., Harley, V.R., Goodfellow, P.N., Lovell-Badge, R. et Bianchi, M.E. (1994). Sex reversing mutations alter the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J.* **13** : 6115-6124.
- Poulat, F., Soullier, S., Gozé, C., Heitz, F., Calas, B. et Berta, P. (1994). Description and functional implications of a novel mutation in the sex determining gene SRY. *Human Mutation* **3** : 200-204.
- Ramkissoon, Y. et Goodfellow, P. (1996). Early steps in mammalian sex determination. *Curr. Op. Gen. Dev.* **6** : 316-321.
- Raynaud, A. et Pieau, C. (1985). Embryonic development of the genital system. In *Biology of the Reptilia* pp149-300. Eds C. Gans and F. Billet New York : Wiley.
- Rhen, T. et Lang, J.W. (1994). Temperature dependent sex determination in the snapping turtle : manipulation of the embryonic sex steroid environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* **96** : 243-254.
- Richard-Mercier, N., Dorizzi, M., Desvages, G., Girondot, M. et Pieau, C. (1995). Endocrine sex reversal of gonads by the aromatase inhibitor letrozole (CGS 20267) in *Emys orbicularis*, a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* **100** : 314-326.
- Rudolf, E., Dorazi, R., Chesnel, A., Durand, D., Bautz, A. et Dournon, C. (1996). *Pleurodeles waltl* et *Pleurodeles poireti* : corrélations entre leur origine nord-africaine ou ibérique et les gènes B ou β de la peptidase 1, enzyme liée au sexe. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **121**: 23-31.
- Scheib, D. (1983). Effects and roles of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* **23** (suppl.) : 587-592.
- Shaw, G., Renfree, M.B., Short, R.V. et O, W.S. (1988). Experimental manipulation of sexual differentiation in wallaby pouch young treated with exogenous steroids. *Development* **104** : 689-701.
- Shen, W.H., Moore, C.C.D., Ikeda, Y., Parker, K.L. et 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.
- Sinclair, A.H., Foster, J.W., Spencer, J.A., Page, D.C., Palmer, M., Goodfellow, P.N. et Graves, J.A.M. (1988). Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex determining gene are autosomal in marsupials. *Nature* **336** : 780-783.
- 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. et 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.

- Smith, C.A. et Joss, J.M.P. (1994a). Steroidogenic activity and ovarian differentiation in the saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93** : 232-245.
- Smith, C.A. et Joss, J.M.P. (1994b). Sertoli cell differentiation and gonadogenesis in *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.* **270**: 57-70.
- Smith, C.A., Elf, P.K., Lang, J.W. et Joss, J.M.P. (1995). Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos. *Differentiation* **58** : 281-290.
- Spotila, L.D., Kaufer, N.F., Therio, E., Ryan, K.M., Penick, D. et Spotila, J.R. (1994). Sequence analysis of the ZFY and Sox genes in the turtle *Chelydra serpentina*. *Molec. Phylogenet. Evol.* **3** : 1-9.
- Stevanovic, M., Lovell-Badge, R., Collignon, J. et Goodfellow, P.N. (1993). SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum. Mol. Genet.* **2** : 2013-2018.
- Stevanovic, M., Zuffardi, O., Collignon, J., Lovell-Badge, R. et Goodfellow, P.N. (1994). The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mammalian Genome* **5** : 640-642.
- Stoll, R., Faucounau, N. et Maraud, R. (1987). Influence of an antiestrogenic drug (tamoxifen) on Mullerian duct agenesis induced by various steroidal sex hormones in the female chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* **66** : 218-223.
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y. et Masayuki, Y. (1990). *Schizosaccharomyces pombe* *stell1+* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev.* **5** : 1990-1999.
- Sullivan, J.A. et Schultz, R.J. (1986). Genetic and environmental basis of variable sex ratio in laboratory strains of *Poeciliopsis lucida*. *Evolution* **40** : 152-158.
- Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R. et Camerino G. (1996). Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenals and hypothalamus function. *Nat. Genet.* **12** : 404-409.
- Tajima, T., Nakae, J., Shinoara, N. et Fujieda, K. (1994). A novel mutation localized in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46, XY gonadal dysgenesis. *Hum. Mol. Genet.* **3** : 1187-1189.
- Taketo, T., Merchant-Larios, H. et Koide, S.S. (1984). Induction of testicular differentiation in the fetal mouse ovary by transplantation into adult male mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **176** : 148-153.

- Thomas, E.O., Licht, P., Wibbels, T. et Crews, D. (1992). Hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with sexual differentiation in embryos of the turtle *Trachemys scripta*. *Biol. Reprod.* **46** : 140-145.
- Thomson, E.A. et Siiteri, P.K. (1973). Studies on the aromatization of C19 androgens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **212** : 378-391.
- Tucker, P.K. et Lundrigan, B.L. (1993). Rapid evolution of the sex determining locus in old world mice and rats. *Nature* **364** : 715-717.
- Uchida, T. (1937). Studies on the sexuality of Amphibia. III Sex transformation in *Hynobius retardatus* by high temperature. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. (Zool.)* **6** : 35-58.
- Uchida, K., Koopman, P., Mita, A., Wakana, S., Wright, E., Kikkawa, Y., Yonekawa, H. et Moriwaki, K. (1996). Exclusion of Sox9 as a candidate for the mouse mutant Tail-short. *Mam. Genome* **7** : 481-485.
- Uwanogho, D., Rex, M., Cartwright, E.J., Pearl, G., Healy, C., Scotting, P.J. et Sharpe, P.T. (1995). Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech. Develop.* **49** : 23-36.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D. et Clevers, H. (1991). Identification and cloning of TCF1, a T lymphocyte specific transcription factor containing a sequence specific HMG-box. *EMBO J.* **10** : 123-132.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., van Norren, K. et Clevers, H. (1993). Sox4, an SRY-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J.* **12** : 3847-3854.
- van de Wetering, M. et Clevers, H. (1993). Sox15, a novel member of the murine Sox family of HMG box transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **21** : 1669.
- van den Hurk, R., Lambert, J.G.D. et Peute, J. (1982). Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry before and after the onset of the gonadal sex differentiation. *Reprod. Nutr. Dév.* **22** : 413-425.
- van den Hurk, R. et van Oordt, P.G.W.J. (1985). Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57** : 216-222.
- Viets, B.E., Tousignant, A., Ewert, M.A., Nelson, C.E. et Crews, D. (1993). Temperature dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J. Exp. Zool.* **265** : 679-683.

- Vigier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran, D. et Josso, N. (1987). Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it *in vitro*. *Development* **100** : 43-55.
- Vigier, B., Forest, M.G., Eychenne, B., Bezard, J., Garrigou, O., Robel, P. et Josso, N. (1989). Anti-Mullerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 3684-3688.
- Vríz, S. et Lovell-Badge, R. (1995). The zebrafish ZfSox19 protein : a novel member of the Sox family which reveals highly conserved motifs outside of the DNA-binding domain. *Gene* **153** : 275-276.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Dagna Bricarelli, F., Keutel, J., Hustert, E., Wolf, U., Tommerup, N., Schemp, W. et Scherer, G. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79** : 1111-1120.
- Waterman, M.R. et Keeney, D.S. (1992). Genes involved in androgen biosynthesis and the male phenotype. *Horm. Res.* **38** : 217-221.
- Webb, G.J.W., Beal, A.M., Manolis, S.C. et Dempsey, K.E. (1987). The effects of incubation temperature on sex determination and embryonic development rate in *Crocodylus johnstoni* et *C. porosus*. In : *Wildlife Management : Crocodiles and Alligators*. pp507-531, G.J.W. Webb, S.C. Manolis and P.J. Whitehead, eds. Surrey Beatty and Sons, Winnelie, Australia.
- Weniger, J.P., Samsel, J. et Zeis, A. (1981). Le tamoxifène contrecarre l'action féminisante des androgènes sur l'embryon de poulet. *C. R. Acad. Sc. Paris Série D* **293** : 451-452.
- Weniger, J.P. (1991). Embryonic sex hormones in birds. *Int. J. Dev. Biol.* **35** : 1-7.
- White, R.B. et Thomas, P. (1992). Adrenal-kidney and gonadal steroidogenesis during sexual differentiation in a reptile with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88** : 10-19.
- Wibbels, T. et Crews, D. (1992). Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. *J. Endocrinol.* **133** : 121-129.
- Wibbels, T. et Crews, D. (1993). Steroid induced sex determination at a near-pivotal temperature in a turtle with TSD. *American Zoologist* **33** : 8A.
- Wibbels, T. et Crews, D. (1994). Putative aromatase inhibitor induces male sex determination in a female unisexual lizard and in a turtle with temperature dependent sex determination. *J. Endocrinol.* **141** : 295-299.

- Wibbels, T., Bull, J.J. et Crews, D. (1994). Temperature dependent sex determination : a mechanistic approach. *J. Exp. Zool.* **270** : 71-78.
- Witschi, E. (1914). Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Keimdrüsen von *Rana temporaria*. *Arch. Mikr. Anat. Entw.* **85** : 9-113.
- Witschi, E. (1929). Studies on sex differentiation and sex determination in Amphibians. II Sex-reversal in female tadpoles of *Rana sylvatica* following the application of high temperature. *J. Exp. Zool.* **52** : 267-291.
- Witschi, E. et Allison, J. (1950). Responses of *Xenopus* and *Alytes* to the administration of some steroid hormones. *Anat. Record* **108** : Abst 589.
- Wright, E.M., Snopek, B. et Koopman, P. (1993). Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res.* **21** : 744.
- Wright, E.M., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A. et Koopman, P. (1995). The Sry-related gene SOX9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* **9** : 15-20.
- Yamamoto, T. (1953). Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* **123** : 571-594.
- Yamamoto, T. (1958). Artificial induction of functional sex reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* **137** : 227-263.
- Yntema, C.L. (1979). Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.* **159** : 17-27.
- Yntema, C.L. et Mrosovsky, N. (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in logger-head turtles. *Can. J. Zool.* **60** : 1012-1016.
- Yoshikura, M. (1959). The action of the pituitary in sex differentiation and sex reversal in amphibians. II Effects of high temperature on the gonads of hypophysectomized frog larvae. *Kumamoto J. Sci. (B)* **4** : 69-101.
- Yu, N.W., Hsu, C.Y., Ku, H.H., Chang, L.T. et Liu, H.W. (1993). Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione. *J. Exp. Zool.* **265** : 252-257.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. et Dailey, L. (1995). Developmental specific activity of the FGF4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct3. *Genes Dev.* **9** : 2635-2645.
- Zaborski, P. (1986). Temperature and estrogen dependent changes of sex phenotype and HY antigen expression in gonads of a newt. In *Progress in Developmental Biology*, Part A, pp 163-169. 1986 Alan R. Liss, Inc.

- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Worley, K.A., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R.B., Meltinger, T., Monaco, A.P., Sassone-Corsi, P. et Camerino, G. (1994). A

novel and unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily is responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* **372**: 635-641.

ANNEXES

Activité aromatasé : larves ZZ élevées à 20°C.

| Stade | St 47 | St 50 | St 52 | St 53 | St 54 | St 55 | St 56 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Activités | 4,6 | 3,7 | 3,9 | 10,1 | 10,8 | 5,9 | 13 |
| | | 7,4 | 4,6 | 14,6 | 11,1 | 7,4 | |
| | | | | 8,2 | 13,2 | | |
| | | | | | 14,1 | | |
| Moyenne | 4,6 | 5,55 | 4,25 | 10,97 | 12,3 | 6,65 | 13 |
| σ | | 2,62 | 0,49 | 3,29 | 1,6 | 1,06 | |

Activité aromatasé : larves ZW élevées à 20°C.

| St. | St 47 | St 50 | St 51 | St 52 | St 53 | St 54 | St 55 | St 56 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Act | 2,1 | 6,7 | 17,5 | 24,5 | 94,6 | 343 | 821 | 1192 |
| | 2,1 | 5 | 29,1 | 16,5 | 103,8 | 473 | 436 | 1196 |
| | 4,7 | 22,6 | 29,4 | 35,5 | 33,4 | 439 | 1140 | |
| | | 23 | | | 154 | | | |
| | | | | | 38,9 | | | |
| | | | | | 35,4 | | | |
| | | | | | 42,8 | | | |
| | | | | 48,2 | | | | |
| | | | | 90,8 | | | | |
| m | 2,97 | 14,32 | 25,33 | 25,5 | 71,32 | 418 | 799 | 1194 |
| σ | 1,50 | 9,81 | 6,78 | 9,54 | 41,74 | 67 | 352 | 2,9 |

Activité aromatasé : larves WW élevées à 20°C.

| Stade | St 47 | St 50 | St 52 | St 53 | St 54 | St 55 | St 56 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Activités | 13,7 | 24,7 | 55,7 | 84,8 | 115 | 527 | 3470 |
| | 2,8 | 20,2 | 21,8 | 103,8 | 182 | 324 | 2722 |
| | 3,6 | 6,2 | 40,3 | 107,1 | 70,8 | 130 | 2582 |
| | 1,8 | 4,2 | 24,8 | 92,5 | | 90,5 | |
| | 4,9 | | 67,4 | | | 100 | |
| | | | 72,6 | | | 108 | |
| | | | 44,9 | | | 322 | |
| | | | | | | 327 | |
| m | 5,36 | 13,82 | 46,78 | 97,05 | 122,6 | 229 | 2924 |
| σ | 4,80 | 10,16 | 19,68 | 10,28 | 56 | 166 | 477 |

Activité aromatasase : larves élevées à 32°C.

| | St 52 | | St 53 | | St 54 | | St 55 | |
|----------|-------|------|-------|-----|-------|------|-------|------|
| | ZZ | ZW | ZZ | ZW | ZZ | ZW | ZZ | ZW |
| | 2,1 | 5,9 | 1,1 | 2,8 | 4,4 | 6,8 | 7,8 | 4,5 |
| | 2,1 | 5,8 | 0,8 | 8,6 | 4,6 | 6,2 | 11,4 | 8,9 |
| | 1,5 | | | | | 6,2 | 13,1 | |
| | 3,9 | | | | | 1,6 | | |
| m | 2,4 | 5,85 | 0,95 | 5,7 | 4,5 | 5,17 | 10,77 | 6,7 |
| σ | 1,04 | 0,07 | 0,21 | 4,1 | 0,14 | 2,4 | 2,71 | 3,11 |

Activité aromatasase : choc thermique de 48 heures à 32°C.

| | ZW | | | W/W | |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | St 53 | St 55 | St 56 | St 52 | St 53 |
| | 17 | 529 | 1472 | 23,4 | 57,4 |
| | 10,3 | 500 | 1531 | 37 | 110,4 |
| | 7,8 | | | 11,3 | 75,9 |
| | 21,6 | | | 17,7 | |
| | 2 | | | | |
| | 13,5 | | | | |
| m | 12,03 | 514,5 | 1501 | 22,35 | 81,23 |
| σ | 6,93 | 20,5 | 41,72 | 10,94 | 26,9 |

Activité aromatasase : larves ZZ inversées par l'oestradiol.

| | St 52 | St 53 | St 54 | St 55 | St 55 | St 55 | St 56 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 h | 5 j | 10 j | 26 j | 71 j | 74 j | 116 j |
| | 6,9 | 7,9 | 14,1 | 3,5 | 217 | 339 | 708 |
| | 11,3 | 7,3 | 17,4 | 2 | 269 | 56,7 | 782 |
| | | 6,6 | 13,4 | 3,2 | 10,6 | 88,5 | 230 |
| m | 9,1 | 7,27 | 14,97 | 2,9 | 165,5 | 161,4 | 57303 |
| σ | 3,11 | 0,65 | 2,14 | 0,79 | 136,7 | 154,6 | 299,6 |

Activité aromatasase : larves traitées 48 heures à l'oestradiol.

| | ZZ | ZW | WW |
|----------|-------|-------|-------|
| | St 53 | St 53 | St 53 |
| | 29,8 | 40 | 21,2 |
| | 20,8 | 29,2 | 10,1 |
| | 27,6 | 22,1 | 4,4 |
| | 12,8 | 22,7 | 13,7 |
| m | 22,75 | 28,5 | 12,32 |
| σ | 7,66 | 8,31 | 6,99 |

Activité aromatasase : test des inhibiteurs.

| | AGT | AGT | AGT | M | M | CGS | CGS |
|----------|--------|--------|--------|----------|--------|------|------|
| | 2 mg/l | 5 mg/l | 7 mg/l | 0,5 mg/l | 1 mg/l | ZW | WW |
| | 80 | 143 | 118,9 | 33,4 | 5,7 | 6,7 | 7,8 |
| | 170 | 111,5 | 90,1 | 52,2 | 15,1 | 4,3 | 3,8 |
| | 91,5 | 128 | | 20,3 | 10,5 | 5,2 | 1,8 |
| | | | | | | 4,6 | 17,4 |
| m | 113,8 | 127,5 | 104,5 | 35,3 | 10,43 | 5,2 | 7,7 |
| σ | 48,98 | 15,75 | 20,36 | 16,03 | 4,70 | 2,76 | 7,99 |

Activité aromatasase : larves ZW traitées par le CGS.

| St 52 | St 53 | St 54 | St 55 | St 55 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2,8 | 3,3 | 3 | 2,5 | 286 |
| 4,7 | 5,9 | 4,5 | 75,4 | 379 |
| 6,7 | 1,5 | 6,1 | 160 | 10,7 |
| 2,5 | | | 41 | 322 |
| | | | 15,4 | 312 |
| | | | 410 | 489 |

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes :

- D. Chardard, A. Chesnel, C. Gozé, C. Dournon, P. Berta (1993). PwSox1 : the first member of the SOX gene family in urodeles. *Nucl. Acids Res.* **21** : 3576.

- D. Chardard, C. Gozé, A. Chesnel, M. Penrad-Mobayed, P. Berta, C. Dournon (1993). PwSox1 : a pleurodeles PCR-isolated sequence that belongs to the SOX gene family. *Int. J. Dev. Biol.* **37**(4) : 3S-4S.

- D. Chardard, G. Desvages, C. Pieau, C. Dournon (1994). 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.

- D. Chardard, A. Chesnel, A. Bautz, C. Dournon (1996). Déterminisme de l'inversion du sexe des gonades chez *Pleurodeles waltl* et *Pleurodeles poireti* (Amphibiens Urodèles) sous l'effet de la température d'élevage. *Bull. Soc. Herp. Fr.*



Nom: **CHARDARD**

Prénom: **Dominique**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I
en **BIOLOGIE CELLULAIRE**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le -9 OCT 1996 UHP 76

Le Président de l'Université



RESUME

L'amphibien *Pleurodeles waltl*, constitue un matériel d'étude intéressant de la détermination sexuelle. Cet amphibien présente un déterminisme génétique du sexe du type ZZ/ZW, et une différenciation sexuelle sensible à la température et aux hormones sexuelles. En effet, des individus de génotype sexuel femelle ZW placés à 32°C pendant une période déterminée de leur vie larvaire (dite période thermosensible du stade 42 au stade 54) se différencient en mâles fonctionnels. Le croisement de thermosensibles ZW avec des femelles standard ZW permet d'obtenir dans la descendance des individus WW qui se différencient en femelles (femelles thélygènes).

Nous avons d'abord recherché chez le pleurodèle une séquence homologue au gène SRY. Ce gène chez les mammifères est le gène de détermination mâle situé sur le chromosome Y et qui initie la mise en place des testicules. Ce gène code pour une protéine comportant un domaine de 80 acides aminés de fixation à l'ADN du même type que celui des protéines HMG (High Mobility Group). Ce domaine HMG de SRY a été retrouvé avec une forte homologie (supérieure à 60% d'acides aminés conservés) dans de nombreux gènes constituant la famille des gènes Sox (SRY-box containing).

Nous avons isolé par PCR avec des amorces ciblées sur les extrémités de la boîte HMG de SRY une séquence Sox chez le pleurodèle, PwSox1 (*Pleurodeles waltl* Sox1). La protéine codée par PwSox1 présente 60% d'acides aminés conservés avec la partie de SRY se liant à l'ADN et 98% avec deux autres protéines découvertes chez le xénope (XSox11) et chez l'homme et la souris (SOX3) (Chardard *et al.*, 1993). Des hybridations *in situ* ARN-ARN sur chromosomes en écouvillon d'ovocytes de pleurodèle ont permis de localiser cette séquence sur l'extrémité du bivalent VI (les chromosomes Z et W constituent le bivalent IV). Au vu de sa séquence protéique et de sa localisation autosomique, PwSox1 n'intervient pas dans la détermination sexuelle et pourrait être l'homologue du gène Sox3 qui chez les mammifères et les oiseaux est impliquée dans le développement du système nerveux.

De nombreuses études ont été réalisées sur le rôle des stéroïdes sexuels dans la détermination du sexe par la température, notamment chez les reptiles. Chez le pleurodèle, des dosages d'activité aromatasé réalisés sur des larves pendant et après la période thermosensible montrent une très forte activité chez les femelles ZW (jusqu'à 1200 fmol/gonade/heure au stade 56) et une activité faible et stable chez les mâles ZZ (13 fmol/gonade/heure au stade 56). L'augmentation de l'activité chez les femelles ZW précède la différenciation histologique du sexe des gonades : dès le stade 50-51, une différence est observable entre l'activité aromatasé des testicules et ovaires présomptifs. Chez les femelles thélygènes WW, l'activité aromatasé est semblable à celle des femelles ZW sauf à la métamorphose où elle est plus importante (3000 fmol/gonade/heure).

Lors de l'inversion sexuelle des femelles ZW par la température, l'activité aromatasé est fortement diminuée et se retrouve au même niveau que celle des mâles ZZ, témoignant ainsi de l'inversion endocrinienne de ces animaux. Des chocs thermiques de 48 heures appliqués sur des larves femelles ZW ont montré que la température n'avait un effet inhibiteur sur l'activité aromatasé que pendant la période thermosensible. Les mêmes chocs thermiques ne semblent pas avoir d'effet sur les larves WW.

Le traitement de larves par le benzoate d'oestradiol a confirmé le rôle féminisant (déjà décrit par L. Gallien) de ce stéroïde chez le pleurodèle.

A la concentration de 100 µg/l dans l'eau d'élevage, le benzoate d'oestradiol induit la différenciation des mâles ZZ en femelles fonctionnelles. En concentration plus importante (600 µg/l) l'oestradiol provoque l'absence de développement des oviductes chez les larves ZZ inversées en femelles et chez les larves ZW. Appliquée pendant 48 heures dans l'eau d'élevage, une concentration de 500 µg/l d'oestradiol provoque une légère augmentation de l'activité aromatasé chez les mâles ZZ (23 fmol/gonade/heure au lieu de 11) mais une diminution de cette activité chez les femelles ZW et WW (28,5 et 12 fmol/gonade/heure au lieu de 71 et 97 respectivement). Ces résultats montrent que l'oestradiol exerce un rétrocontrôle sur l'aromatasé.

L'inhibiteur d'aromatasé fadrozole appliqué du stade 52 au stade 55 provoque une diminution de l'activité aromatasé et l'inversion d'une partie des larves ZW traitées. Chez les femelles inversées, l'histologie et l'activité aromatasé des gonades est semblable à celles des gonades de larves ZZ.

De même, la dihydrotestostérone, un androgène non aromatisable, entraîne la masculinisation de femelles génétiques, contrairement à la testostérone qui est aromatisable en oestradiol et qui exerce un effet paradoxal en inversant des mâles ZZ en femelles.